



Andreia Catarina Roxo Gonçalves

Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública

Infeção pelo Vírus do Herpes Humano 6 na convulsão febril

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Médica

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão,
Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof. Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Vogal: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2014

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO

- **“Infecção pelo Vírus do Herpes Humano 6 na convulsão febril”**, Andreia Gonçalves¹, Paulo Paixão¹, Maria Jesus Chasqueira¹, Tiago Silva², Sandra Jacinto², Maria João Brito², Gonçalo Cordeiro Ferreira², Sofia Bravo³, Virgínia Loureiro³, Rosa Barros³, Teresa Marques¹

Poster apresentado no **IV Congresso Nacional de Virologia – VIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia**, no Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa, nos dias 25 e 26 de Outubro de 2013.

¹ Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, CEDOC, Lisboa.

² Unidade de Infeciologia do Hospital D. Estefânia–CHLC.

³ Departamento de Patologia Clínica do Hospital D. Estefânia–CHLC.

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho desta natureza conduz, obrigatoriamente, ao auxílio e colaboração de pessoas, às quais quero demonstrar a minha gratidão e destacar aqueles que mais contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Prof. Doutor Paulo Paixão, pela oportunidade de realizar a minha tese de mestrado sobre a sua orientação, em especial pela paciência, confiança e incentivo sempre expressos. As suas sugestões e críticas foram uma contribuição decisiva para a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Jesus Chasqueira, Lúcia Rodrigues e Otilia Campos um muito obrigada pela disponibilidade de ajuda, pela preocupação no acompanhamento das várias fases da dissertação, pelo constante incentivo e principalmente pelo apoio e simpatia com que me acolheram.

Ao Dr. Tiago Silva, à Dra Maria Joao Brito, à Dra Virgínia e à Sofia Bravo obrigada pela dedicação, tempo despendido, obtenção de produtos biológicos e respetivas informações clínicas, pois sem a sua ajuda este projeto não seria possível.

À Patricia, um obrigado muito especial pela amizade e apoio durante todo este tempo.

Aos meus amigos e familiares, que sabem o quão difícil foi chegar até aqui, obrigada pela força e motivação que me transmitiram.

Á minha mãe e ao meu pai, pela educação e formação que me deram, por me inculcarem o espírito de dedicação e perseverança, entre outros valores que regem a minha vida.

Em especial à minha mãe, por estar sempre presente, confiar nas minhas capacidades e por me fazer acreditar em mim mesma.

RESUMO

O vírus herpes humano 6 (HHV-6) é o agente responsável pelo exantema súbito em crianças. Algumas publicações sugerem uma associação entre a infecção por este vírus e a convulsão febril na idade pediátrica. Que seja do nosso conhecimento, nunca se tinha realizado em Portugal uma investigação sobre este assunto. O presente trabalho tem como objetivo principal determinar a taxa de infeções pelo HHV-6 num grupo de crianças com o diagnóstico clínico de convulsões febris.

A população estudada foi constituída por 49 crianças (com idades compreendidas entre os 4 meses e os 5 anos) que recorreram ao Serviço de Urgência do Hospital D. Estefânia – CHLC, com quadro clínico de convulsão febril. Na fase aguda recolheram-se amostras de soro, de sangue total e de plasma. Após 4 a 8 semanas foi realizada uma 2ª colheita de soro em 16 crianças. Os métodos utilizados foram: PCR em tempo real para deteção do DNA do HHV-6 em amostras de sangue total e plasma; ELISA para pesquisa de IgM, IgG e avidéz das IgG para o HHV-6 em amostras de soro. Sendo os resultados da ELISA confirmados por Imunofluorescência; duas PCR em tempo real, *in house* e comercial, para deteção do DNA do HCMV; ELISA para pesquisa de IgG e avidéz das IgG para o HCMV.

Num total de 49 crianças com convulsão febril, 4 tiveram infeção primária por HHV-6, 18 provável infeção secundária (reinfeção ou reativação) e 7 tiveram infeção por HCMV. A deteção de HHV-6 no sangue total é mais sensível do que no plasma ($p=0,005$). Salienta-se a elevada percentagem de casos de virémia associada a serologia positiva. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro relato de casos de infeção por HCMV associado à convulsão febril. Durante este estudo não foi detetada qualquer associação entre as infeções por HHV-6 e HCMV.

ABSTRACT

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is the etiological agent of exanthema subitum. Some studies suggest an association between human herpesvirus 6 infection and febrile seizures in childhood. To our knowledge, in Portugal had never been conducted an investigation on this subject. The main goal of this study is to determine the rate of HHV-6 infection in a group of children with a clinical diagnosis of febrile seizures.

The study population consists in 49 children (age between 4 months and 5 years) who presented with febrile seizures at emergency department of Hospital D. Estefânia - CHLC. In the acute phase were collected serum, whole blood and plasma samples. 4 to 8 weeks later was collected a second serum sample 16 children. The methods used were: real-time PCR for detection of HHV-6 DNA in whole blood and plasma samples; ELISA for IgM, IgG and IgG avidity of HHV-6 in serum samples. ELISA results were confirmed by immunofluorescence; two real-time PCR, commercial and in house, for the detection of HCMV DNA; ELISA for detection of IgG and IgG avidity of HCMV.

From a total of 49 children with febrile seizures, 4 had primary HHV-6 infection, 18 had a probable secondary infection (reactivation or reinfection) and 7 had HCMV infection. The detection of HHV-6 in whole blood is more sensitive than in plasma ($p = 0.005$). We emphasize the high percentage of cases of viraemia associated with positive serology. To our knowledge, this is the first reported cases of HCMV infection associated with febrile seizures. During this study was not detected any association between HHV-6 and HCMV infections.

ÍNDICE GERAL

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO	II
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Contextualização Histórica.....	1
1.2 – Características Gerais da Família Herpesviridae	2
1.3 – Morfologia e Estrutura do Vírus Herpes Humano 6	4
1.3.1 – Genoma e Organização do Vírus Herpes Humano 6.....	5
1.4 – Estratégia de Replicação Viral.....	8
1.4.1 – Tropismo Celular	12
1.5 – Epidemiologia.....	13
1.6 – Formas de Transmissão	13
1.7 – Patogénese do Vírus Herpes Humano 6	14
1.7.1 – Infecção Primária e Manifestações Clínicas	15
1.7.2 – Fase de Latência	16
1.7.3 – Integração do HHV-6 no Cromossoma Humano	17
1.7.4 – Processo de Reativação do HHV-6	17
1.7.5 – Associação do HHV-6 a outros Quadros Clínicos	19
1.8 – Objetivo do Estudo.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 – Desenho do Estudo.....	22
2.2 – População	22
2.3 – Amostras.....	22
2.3.1 – Transporte, Tratamento e Conservação das Amostras	23
2.4 – Resumo do Procedimento Experimental	24
2.5 – Diagnóstico Laboratorial do HHV-6.....	25
2.5.1 – Serologia do HHV-6.....	25
2.5.2 – Detecção e quantificação de DNA HHV-6.....	27

2.5.3 – Detecção e quantificação de RNA do HHV-6	29
2.6 – Diagnóstico Laboratorial do HCMV	31
2.6.1 – Detecção e quantificação de DNA HCMV	31
2.6.2 - Serologia HCMV	34
3. RESULTADOS	35
3.1 – Dados gerais da população em estudo.....	35
3.2 – Resultados do estudo do HHV-6.....	37
3.2.1 – Serologia para HHV-6	37
3.2.2 – Carga viral do HHV-6.....	40
3.2.3 – Pesquisa de RNA do HHV-6.....	42
3.2.4 – Relação entre a carga viral e a serologia do HHV-6	43
3.3 – Resultados do estudo do HCMV.....	44
3.3.1 – Carga viral do HCMV.....	44
3.3.2 – Serologia para o HCMV	45
3.4 – Relação entre o HHV-6 e o HCMV	46
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS.....	74
ANEXO I.....	75
ANEXO II	76
ANEXO III	77
ANEXO IV	78
ANEXO V	80
ANEXO VI.....	81
ANEXO VII.....	82
ANEXO VIII	83
ANEXO IX.....	84
ANEXO X	85
ANEXO XI.....	90
ANEXO XII.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética dos herpesvírus, baseada no alinhamento das sequências dos aminoácidos de genes homólogos.....	4
Figura 2 - Organização genética do Virus Herpes Humano 6.	6
Figura 3 - Ciclo replicativo dos herpesvírus.	9
Figura 4 - Interação entre o complexo de glicoproteínas do HHV-6 e os recetores celulares.	10
Figura 5- Expressão dos genes e a sua função durante a infeção.	11
Figura 6 - Esquema da componente prática do trabalho.	24
Figura 7 - Tempo de resposta imunitária após infeção por HHV-6.....	25
Figura 8 - Resumo esquemático da síntese à deteção de RNA de HHV-6.....	29
Figura 9 - Diluições seriadas para preparação de padrões e calibradores para a técnica de PCR em tempo real <i>in house</i>	33
Figura 10 - Resultados da pesquisa de RNA de HHV-6 por PCR em tempo real.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonómica dos vírus da família <i>Herpesviridae</i> , patogénicos para o Homem, com base no ICTV.....	3
Tabela 2 - Famílias de genes do HHV-6 e do HCMV	8
Tabela 4 - Resultados obtidos na técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-HHV-6, nas amostras fornecidas pelo INSA.	39
Tabela 5 - Análise da avidéz das IgG para o HHV-6 com a variação da concentração de ureia e diluição da amostra A1.....	39
Tabela 6 - Resultados da avidéz das IgG anti-HHV-6 em comparação com os resultados obtidos na técnica de IFA.	40
Tabela 7 - Resultados obtidos na técnica de PCR em tempo real, em crianças cujas amostras de sangue total e plasmas foram simultaneamente estudadas	42
Tabela 8 - Relação do número de cópias/ml de DNA de HCMV obtido em ambas as técnicas de PCR em tempo real.....	45
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos na serologia do HCMV.....	46
Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos para a deteção de HHV-6 e HCMV ...	46
Tabela 11 - Relação entre o número de cópias/ml de DNA de ambos os vírus e a respetiva serologia e avidéz.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CHLC - Centro Hospitalar de Lisboa Central

CMV - Vírus Citomegálico Humano ou Citomegalovírus

Ct – Cycle Threshold

DNAses- Desoxirribonucleases

dNTPs – Desoxinucleósidos Trifosfatos

DR - *terminal direct repeats*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

HBLV- *Human B Lymphotropic Vírus*

HDE – Hospital D. Estefânia

HHV-6 – Vírus do Herpes Humano 6

HHV-7 - Vírus do Herpes Humano 7

HTLV- *Human T Lymphotropic Vírus*

IFA - *Immunofluorescent assay*

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

Kb- Kilo base

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mRNA – RNA mensageiro

MS- Esclerose Múltipla

NF-κB – *nuclear factor-kappa B*

OMA – otite média aguda

ORF - *Open Reading Frames*

Pb – Pares de base

PCR – *Polymerase chain reaction*

RNAses - Ribonucleases

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells*

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema nervoso central

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são agentes infecciosos microscópicos, cujos genomas são constituídos por ácidos nucleicos, que se replicam apenas no interior de células vivas de outros organismos. Estas entidades usam a maquinaria das células infetadas para a síntese de novas partículas virais, que podem transferir o genoma para outras células, infetando-as. A família *Herpesviridae* engloba vírus que são bastante comuns no Reino Animal, tendo sido até à data isolados cerca de 120 herpesvírus distintos em várias espécies. Estes vírus são ubíquos, podem induzir uma grande variedade de doenças, e após a primoinfeção permanecem no organismo sob a forma latente. As infeções são geralmente benignas, mas podem causar, em determinados hospedeiros, morbilidade e mortalidade significativas. Atualmente, são conhecidos nove herpesvírus patogénicos para o Homem.

1.1 – CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA

O Vírus Herpes Humano 6 (HHV-6) foi isolado pela primeira vez em 1986, por Salahuddin e colaboradores, em células mononucleadas do sangue periférico de indivíduos com distúrbios linfoproliferativos e SIDA^{5,14,38}. Inicialmente, foi caracterizado como um vírus com tropismo para as células B humanas, tendo sido designado de *Human B Lymphotropic Virus* (HBLV), visto ter sido, primariamente, isolado em linfócitos B de indivíduos infetados com HIV, HTLV e doenças linfoproliferativas^{9,25}.

Mais tarde, o vírus foi renomeado de HHV-6, com base nas recomendações do ICTV (Comité Internacional para a Taxonomia dos Vírus).

Em 1988, Yamanishi e colegas estabeleceram a ligação etiológica entre o HHV-6 e a doença humana, descrevendo assim, a associação do vírus ao exantema súbito (ou *Roseola infantum*). Subsequentemente, verificou-se que o HHV-6 é um agente ubíquo, que infeta a maioria dos indivíduos nos primeiros anos de idade^{9,14}.

As estirpes GS do HHV-6 foram isoladas a partir de leucócitos de indivíduos imunocomprometidos com distúrbios linfoproliferativos. Pouco tempo depois, descobriram-se outras estirpes (U1102 e Z29), que foram isoladas no Uganda e no Zaire em doentes com SIDA¹¹⁸.

A partir destas descobertas e com base na epidemiologia, estudos clínicos e moleculares, propriedades de crescimento *in vitro*, reatividade a anticorpos monoclonais, mapeamento por endonucleases de restrição e sequência de nucleótidos, emergiram dois grupos diferentes de HHV-6, a variante A (HHV-6A) e a variante B (HHV-6B)^{9,14,25}. Embora estes dois vírus sejam estreitamente relacionados, apresentando uma semelhança genómica de 90%, são biológica, imunológica e epidemiologicamente distintos^{14,20}. De acordo com a sugestão do ICTV, foi obtido um consenso para que as estirpes GS e U1102 fossem reconhecidas como HHV-6A, e a estirpe Z29 como HHV-6B¹⁸.

Em 1993, *Luppi et al.* identificaram o genoma do HHV-6 ligado a DNA celular de alto peso molecular em células mononucleares do sangue periférico de três pacientes. Posteriormente, Arbuckle demonstrou a integração de HHV-6A e HHV-6B nos telómeros dos cromossomas humanos durante a latência, assim como, a reativação viral do seu estado integrado⁹.

Em 2012, devido à significativa divergência e clara segregação das duas variantes, com base nos critérios anteriormente referidos, o ICTV reconheceu o HHV-6A e o HHV-6B como duas espécies distintas de herpesvírus^{25,73}.

1.2 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA HERPESVIRIDAE

A família *Herpesviridae* divide-se em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae* (Figura 1). Todos os membros desta família têm características em comum, como a habilidade de estabelecer latência após a infeção primária e reativarem em pacientes imunocomprometidos³⁹.

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos vírus da família *Herpesviridae*, patogênicos para o Homem, com base no ICTV.

Subfamília	Gênero	Espécie	Nome comum
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvírus</i>	Vírus do herpes humano 1	Vírus do Herpes Simples 1
		Vírus do herpes humano 2	Vírus do Herpes Simples 2
	<i>Varicellovírus</i>	Vírus do herpes humano 3	Vírus da Varicela-Zoster
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Citomegalovírus</i>	Vírus do herpes humano 5	Vírus Citomegálico Humano
	<i>Roseolovírus</i>	Vírus do herpes humano 6A	
		Vírus do herpes humano 6B	
		Vírus do herpes humano 7	
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovírus</i>	Vírus do herpes humano 4	Vírus de Epstein-Barr
	<i>Rhadinovírus</i>	Vírus do herpes humano 8	

A distinção entre as subfamílias é possível tanto pelas diferentes características víricas (nomeadamente, estrutura genômica, tropismo celular, citopatologia e localização da infecção latente), como pelo poder patogênico e quadros clínicos provocados.

Apesar da divergência biológica e evolucionária, os nove herpesvírus classificados nas três sub-famílias acima referidas, partilham um grande número de genes evolutivamente conservados. Estes genes exercem funções das quais todos os herpesvírus dependem, isto é, exibem a mesma estrutura do virião, o mesmo processo de replicação do genoma e a entrada e saída dos vírus das células é idêntica.

As duas maiores linhagens da subfamília *Betaherpesvirinae* são os gêneros citomegalovírus e roseolovírus. Dos betaherpesvírus distinguem-se, o HHV-6, HHV-7 e

o vírus citomegálico ou citomegalovírus (HCMV). Os dois primeiros fazem parte do género roseolovírus, sendo o HHV-6 dividido ainda em duas espécies: HHV-6A e HHV-6B^{2,5}. Enquanto o último, também conhecido por *Herpesvírus Humano 5* (HHV-5) é membro do género citomegalovírus. O HHV-6A e HHV-6B foram classificados como membros desta subfamília, visto serem mais homólogos do HCMV do que dos restantes herpesvírus, Alphaherpesvírus ou Gammaherpesvírus.

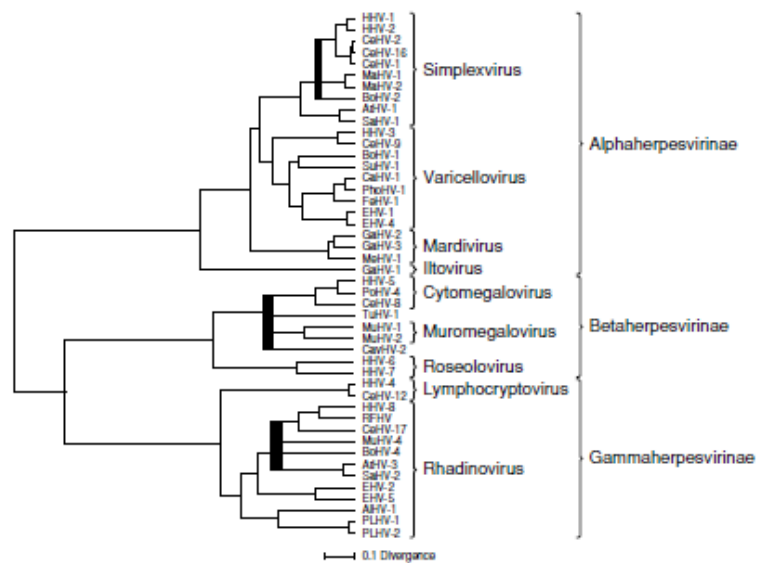


Figura 1 - Árvore filogenética dos herpesvírus, baseada no alinhamento das sequências dos aminoácidos de genes homólogos¹⁰⁰.

1.3 – MORFOLOGIA E ESTRUTURA DO VÍRUS HERPES HUMANO 6

Os betaherpesvírus dos mamíferos, provavelmente tiveram um ancestral comum há 50 milhões de anos.

O HHV-6 é estruturalmente semelhante a outros membros da família *Herpesviridae*, nomeadamente ao HCMV, possuindo uma nucleocápside icosaédrica com diâmetro que varia entre 90 a 110 nm, constituída por 162 capsómeros proteicos, que envolvem e protegem o material genético viral^{43,56}. Os viriões dos herpesvírus são constituídos pelo core, tegumento e invólucro lipídico cravejado de glicoproteínas. O virão do HHV-6 apresenta entre 160 a 200 nm de diâmetro²⁰. O invólucro, a camada mais externa que

envolve a cápside, com aproximadamente 20 a 40 nm de espessura, é composto por uma bicamada lipídica, onde se encontram as glicoproteínas. Estas proteínas são responsáveis pela resposta imune do hospedeiro, uma vez que são os recetores de ligação do vírus aos anticorpos que o neutralizam, aos recetores das células do hospedeiro, permitindo a entrada do vírus nestas células⁴⁷. Entre a cápside e o invólucro viral está localizado o tegumento, um compartimento de proteínas virais de função estrutural ou não estrutural. As primeiras desempenham um importante papel na entrada do vírus na célula hospedeira, bem como na construção e libertação do novo vírus da célula. As restantes proteínas têm como função proteger o vírus da resposta imune do hospedeiro face à infeção.

1.3.1 – GENOMA E ORGANIZAÇÃO DO VÍRUS HERPES HUMANO 6

O genoma deste vírus consiste numa molécula de DNA linear de cadeia dupla, com 160 a 170 kb, tendo sido totalmente sequenciado em 1995. Vários genes do HHV-6, organizados em sete blocos conservados, estão presentes no genoma de todos os herpesvírus³⁸.

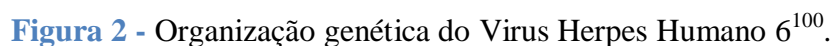
Estes genes do core são conservados nos herpesvírus dos mamíferos e codificam para proteínas estruturais, como as proteínas da cápside, as glicoproteínas e proteínas não estruturais necessárias à replicação viral⁴³.

Um bloco de genes adicional, que compreende 17 genes conservados, está presente apenas nos betaherpesvírus, US22^{38,56}. Há, também, genes específicos dos roseolovírus, que estão ausentes nos outros herpesvírus, nomeadamente o U20-U21, U23-U24, U26, U85 e U100^{20,116}. No entanto, somente dois genes são únicos no HHV-6 e presentes nas duas espécies, os genes U83 e U94³⁸.

O gene U83 codifica para a quimiocina e tem atividade quimiostática para células monocíticas³⁸.

O gene U94 é um fator de transcrição, que se liga à proteína de ligação humana TATA e é transcrito em linfócitos com infeção latente. O que sugere que contribui para a manutenção da latência. Alguns estudos *in vitro* mostraram que a proteína U94 inibe fortemente a replicação do HHV-6 em células infetadas, confirmando a sua função

O HHV-6A e 6B codificam 119 ORF, localizadas na região U⁴¹. As ORF são designadas por U1 a U100, das quais nove estão ausentes no HHV-6A, e são únicas para o HHV-6B (B1 a B9)^{20,38}. As regiões codificantes estão localizadas em ambas as cadeias de DNA e poucos genes sofrem *splicing* após a transcrição⁴³.



O HHV-6A e HHV-6B têm 90% de homologia na sequência de nucleótidos, sendo algumas regiões de DNA conservadas entre as duas espécies, enquanto outras regiões apresentam variabilidade concordante com as regiões específicas²⁰. A diferença da homologia na sequência de nucleótidos é mais variável na extremidade direita da região U (U86 – U100). Alguns genes deste extremo codificam para proteínas IE (*Immediate Early*), onde o HHV-6A e HHV-6B são mais divergentes. Essas diferenças são importantes nas propriedades biológicas distintas de cada espécie. Os três genes do HHV-6B (B3, B6 e B7) também codificam para proteínas IE e proporcionam mais evidências de que estas espécies têm comportamentos biológicos diferentes⁴³.

As diferenças nas propriedades fenotípicas entre ambos são perceptíveis através da glicoproteína Q do invólucro (gp82/105), codificada pelo gene U100, envolvido na ligação do recetor viral e na fusão da membrana. As diferenças nas sequências homólogas do gene U100 podem contribuir para os diferentes tropismos entre o HHV-6A e 6B⁴³.

O conteúdo de guanina e citosina presente no HHV-6 é de 43-44%, sendo o mais baixo de todos os herpesvírus conhecidos. O genoma com o qual este vírus apresenta maior homologia é com o do HCMV, com 67% de proteínas homólogas^{47,118}. O que aparenta serem provenientes de duas linhagens evolucionárias distintas (citomegalovírus e roseolovírus)¹. Comparações entre o HHV-6 e o HCMV revelam que o genoma do HCMV é aproximadamente 50% mais longo e mais complexo, com vários genes em falta no HHV-6 e tem um segmento genómico que é colinear de um fragmento de 115 kb do HHV-6⁵⁶.

Tabela 2 - Famílias de genes do HHV-6 e do HCMV³⁷.

Family	HCMV	HHV-6	Features and putative functions
RL11	RL5A, RL6, RL11, RL12, RL13, UL1, UL4, UL5, UL6, UL7, UL8, UL9, UL10, UL11	None	Most are membrane glycoproteins; most share a putative immunoglobulin domain with certain human adenovirus E3 proteins
UL14	UL14, UL141	None	Membrane glycoproteins containing an immunoglobulin domain; UL141 is involved in NK cell evasion
UL18	UL18, UL142	None	MHC-I-related membrane glycoproteins; involved in immune evasion
US22	UL23, UL24, UL26, UL28, UL29, UL36, UL43, US22, US23, US24, US26, IRS1, TRS1	U2, U3, U7, U8, U17, U25, U95, DR1, DR6	Tegument proteins; involved in modulation of the cellular response
UL25	UL25, UL35	U14	Tegument proteins
GPCR	UL33, UL78, US27, US28	U12, U51	Chemokine receptors; some may have been captured independently
DURP	UL31, UL72, UL82, UL83, UL84	U10, U45, U54, U55 (U55A, U55B in HHV-7)	Derived from dUTPase; some are tegument proteins; multiple roles in modulating cellular responses
UL120	UL120, UL121, possibly UL119	Possibly U85	Membrane glycoproteins; possibly derived from OX-2
UL146	UL146, UL147	None	CXC chemokines
US1	US1, US31, US32	None	Related to TT virus ORF2
US2	US2, US3	None	Membrane glycoproteins; roles in immune evasion
US6	US6, US7, US8, US9, US10, US11	None	Membrane glycoproteins; roles in immune evasion
US12	US12, US13, US14, US15, US16, US17, US18, US19, US20, US21	None	Multiple transmembrane proteins

Apesar da divergência biológica entre o HCMV e os três roseolovírus (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7), existem algumas semelhanças biológicas que sugerem a conservação evolucionária. Nomeadamente, o tropismo para as células hematopoiéticas da linhagem mieloide e os genes de latência com estrutura e localização semelhantes⁴³.

Os betaherpesvírus distinguem-se dos alfa herpesvírus e dos gama herpesvírus através da codificação de genes pertencentes à família do gene US22 do HCMV (Tabela 2).

1.4 – ESTRATÉGIA DE REPLICAÇÃO VIRAL

Os vírus dependem de um hospedeiro vivo para se reproduzirem, uma vez que não se podem replicar fora do hospedeiro. Por este motivo são considerados parasitas intracelulares obrigatórios.

Os herpesvírus entram nas células por ligação a um recetor celular existente à superfície da membrana celular. Após a ligação do HHV-6 aos recetores da membrana celular, os viriões são internalizados em vesículas, por endocitose. No citoplasma, dá-se a remoção do invólucro da partícula viral e a nucleocápside é transportada através de microtúbulos até ao poro nuclear, onde ocorre a libertação do DNA viral para o núcleo da célula⁴². No núcleo, inicia-se a transcrição dos genes virais e a replicação do DNA viral. A replicação do DNA viral começa no oriLyt localizado entre a extremidade 5' do gene U41 e a extremidade 3' do gene U42. O genoma viral é transcrito em mRNA por enzimas celulares existentes no virião. Em seguida, o genoma viral é envolvido pela nucleocápside e sai do núcleo. No citoplasma, o virião adquire o tegumento e o invólucro. Por fim, na fase madura, a partícula viral deixa a célula (Figura 3)³⁸.

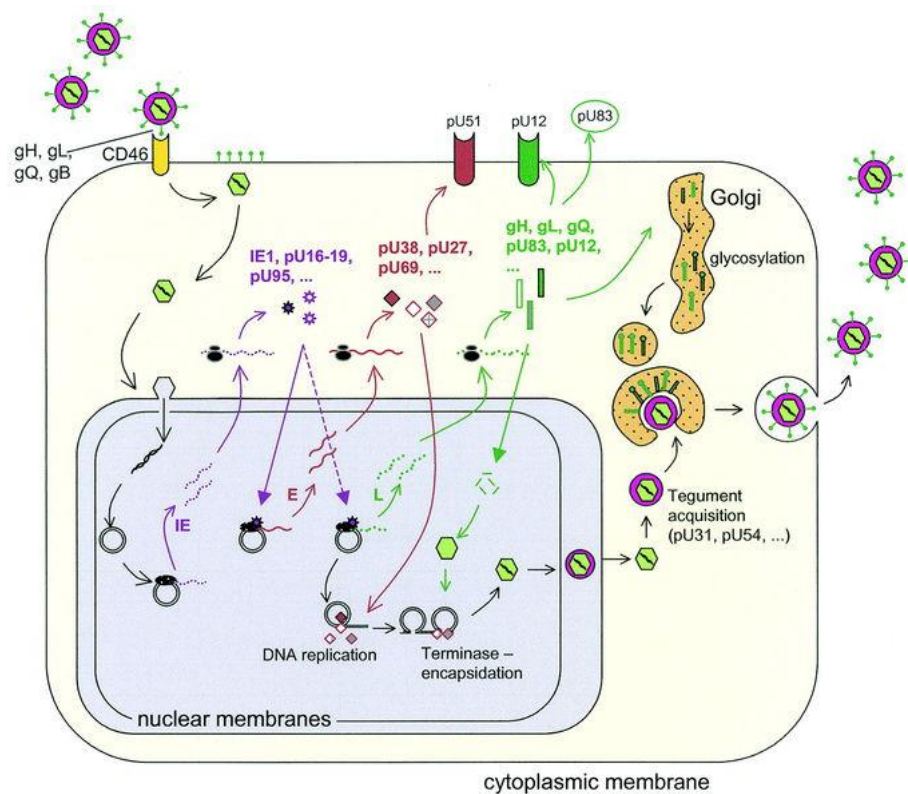


Figura 3 - Ciclo replicativo dos herpesvírus. Entrada na célula hospedeira e expulsão de viriões³⁸.

O recetor celular que permite a ligação do vírus HHV-6 à célula é o CD₄₆, que é também utilizado por outros vírus e bactérias. O CD₄₆ é amplamente expresso pelas células nucleadas e tem como função regular a ativação do complemento^{5,26,109,131}.

As glicoproteínas codificadas pelos herpesvírus são cruciais na ligação aos recetores celulares, penetração nas células, disseminação célula-a-célula e formação de partículas virais. Estas glicoproteínas são importantes na fusão celular, mas não significa que tenham de interagir fisicamente com o recetor CD₄₆¹⁴¹.

O complexo gH-gL-gB é essencial para que a fusão com a membrana celular ocorra, libertando a cápside viral para o citoplasma. Este heterodímero é altamente conservado nos herpesvírus, cujas glicoproteínas são codificadas pelos genes U48, U82 e U39, respetivamente³⁸. O heterodímero gH-gL pode associar-se a uma proteína adicional que proporciona a especificidade de recetor. Para melhor caracterizar as glicoproteínas envolvidas na fusão, foi demonstrado que o heterodímero gH-gL também forma um complexo tripartido com gQ. A glicoproteína gQ é codificada pelo gene U100, presente nos viriões do HHV-6 e HHV-7 e é o ligando viral do CD₄₆^{107,108}.

Nos viriões do HHV-6B foi detetado um segundo complexo, gH-gL-gO (gO é codificado pelo gene V47), que não interage com o recetor CD₄₆ (Figura 4). Verificou-se, assim, que o HHV-6B tem menor afinidade para o recetor CD₄₆, em comparação com o HHV-6A¹⁰⁹.

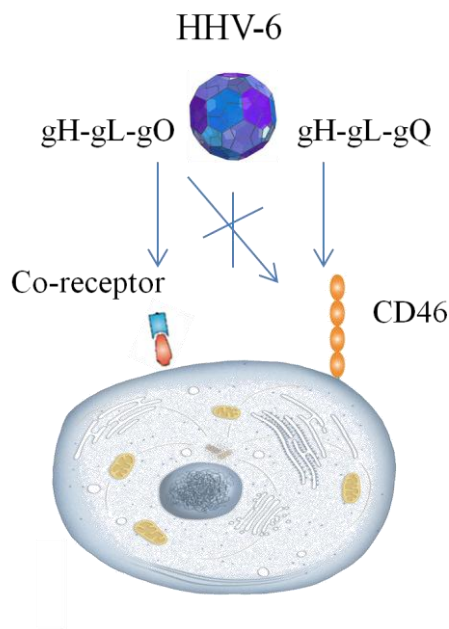


Figura 4 - Interação entre o complexo de glicoproteínas do HHV-6 e os recetores celulares.

Os genes virais são transcritos de modo bem regulado e estão divididos do seguinte modo:

- *Immediate Early Genes* (genes IE), independentes da síntese de novas proteínas, codificam para fatores de transcrição e proteínas reguladoras e ativam os genes E;
- *Early Genes* (genes E), codificam proteínas importantes para o metabolismo e replicação de DNA viral, como a DNA polimerase viral;
- *Late Genes* (genes L), ativados pelo DNA viral e proteínas virais, codificam para proteínas estruturais, importantes na montagem do virião (Figura 5)¹¹⁶.

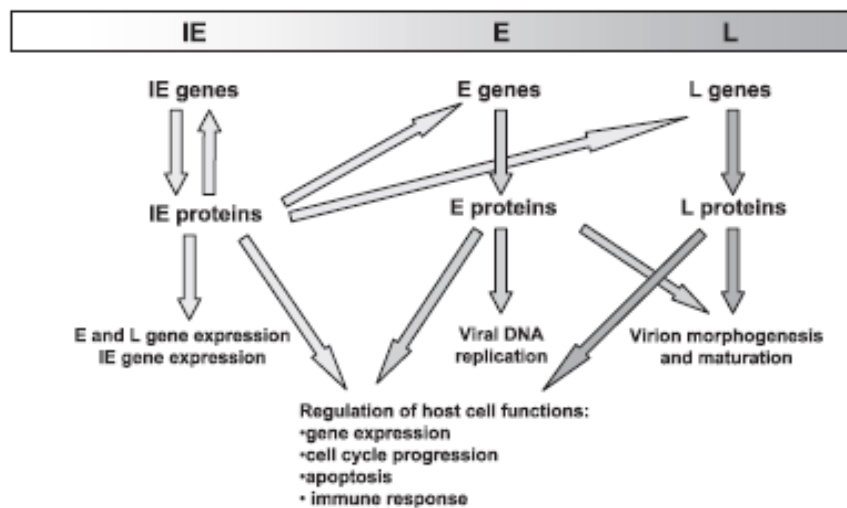


Figura 5- Expressão dos genes e a sua função durante a infecção.

O HHV-6A e 6B apresentam, entre si, diferenças temporais na expressão de genes virais e também apresentam padrões de *splicing* diferentes. No caso do HHV-6B, o ciclo de replicação pode ser subdividido em seis classes cinéticas: Grupos I e II, que correspondem aos genes IE, grupos III e IV que correspondem aos genes E e L e grupos V e VI correspondentes aos genes L^{104,116}.

À medida que ocorre a síntese de DNA viral, a molécula circular funciona como molde de replicação, resultando em múltiplas cópias de DNA viral, que são encapsuladas através de proteínas de clivagem e montagem.

O tempo necessário para que ocorra um ciclo de replicação viral, desde a infecção até à libertação de novos viriões da célula, é aproximadamente de 72h^{20,38}.

1.4.1 – TROPISMO CELULAR

Tropismo celular é a predileção que os vírus têm para determinado tipo de células, em detrimento de outras.

Inicialmente pensou-se que o HHV-6 infetava linfócitos B, o que originou a designação de vírus B-linfotrópico. Atualmente, o HHV-6 é considerado um vírus T-linfotrópico, uma vez que ambas as espécies infetam linfócitos T CD₄⁺, mas os linfócitos B não são infetados pelo HHV-6. Os linfócitos T CD₈⁺ e as células NK são altamente suscetíveis à infecção pelo HHV-6A, *in vitro*^{38,111}.

Contudo, o HHV-6 tem a capacidade de infetar uma grande variedade de células, *in vivo* ou *in vitro*, o que é consistente com a natureza ubíqua do seu recetor celular, CD₄₆¹³¹.

In vitro, foi detetado DNA do HHV-6B em granulócitos, monócitos, linfócitos T CD₄⁺ e T CD₈⁺, dependendo da sua diferenciação⁷⁶. Este vírus também apresenta tropismo para o tecido linfoide e pode infetar o SNC, assim como células epiteliais e endoteliais. É plausível que os PBMC sejam infetados durante a infecção primária⁶³.

Após a primoinfecção, o vírus é disseminado para outros tecidos, provocando infecção nas células endoteliais. Vários estudos identificaram, *in vivo*, a presença de DNA do HHV-6 no endotélio vascular, assim como, danos ao nível das células endoteliais, originados pelo vírus¹.

O HHV-6 é um vírus neurotrópico, ou seja, tem a capacidade para infetar células neuronais^{20,91}. Alguns estudos sustentam a hipótese de que o HHV-6A é mais neurotrópico do que o HHV-6B, uma vez que este último raramente é identificado nos doentes⁶³.

A notável diversidade de tropismo celular e tecidual deste vírus é justificada pelo recetor CD₄₆ que está presente na superfície das células nucleadas^{131,132}.

1.5 – EPIDEMIOLOGIA

O HHV-6 é um vírus com distribuição mundial, mais de 90% dos adultos apresentam anticorpos contra este vírus^{20,21,24,31}.

Estudos epidemiológicos demonstram que o HHV-6 tem elevada prevalência na população humana, uma vez que a infecção primária ocorre entre os seis meses e os dois anos de idade¹¹⁵.

O HHV-6 é responsável por uma importante percentagem das visitas pediátricas às urgências, por convulsões febris e pode, inclusivamente, levar à hospitalização de crianças. A maioria das infecções nos imunocompetentes é causada por HHV-6B^{20,51}.

A associação com o HIV induz algumas variações geográficas entre o HHV-6A e o HHV-6B. Por este motivo, o HHV-6A tem sido identificado mais frequentemente na região do Zâmbia⁸².

A reativação do HHV-6B é mais frequente do que a do HHV-6A em indivíduos transplantados^{20,25}.

A associação entre a infecção primária e a convulsão febril em crianças tem-se verificado entre os 12 e os 15 meses de idade. Neste grupo etário, cerca de 36% das crianças com primoinfecção por HHV-6 manifestaram convulsões, em contraste com 13% de crianças sem doença febril relacionada com o HHV-6²¹. Entre as crianças que apresentaram convulsões febris originadas por HHV-6, a incidência de convulsões febris recorrentes é significativamente menor do que nas crianças que tiveram convulsões febris provocadas por outros motivos, respetivamente 20% versus 40%. No entanto, verificou-se que a frequência de convulsões com formas mais severas é significativamente mais elevada entre crianças com infecção primária por HHV-6 do que em crianças que não apresentavam esta primoinfecção²¹.

1.6 – FORMAS DE TRANSMISSÃO

O modo de transmissão não é claro, mas o HHV-6 replica-se nas células epiteliais e está presente na saliva, o que sugere que as secreções orais contribuem para a transmissão,

especialmente do HHV-6B²⁰. Cerca de 83-100% da população adulta saudável apresenta HHV-6B na saliva, enquanto menos de 1% manifesta HHV-6A na saliva. A sua frequência difere pouco entre crianças e adultos. Com base nestas observações, conclui-se que a transmissão horizontal através da saliva é a via de transmissão mais comum²³.

A presença de DNA de HHV-6 nos leucócitos de 30% das crianças durante o primeiro mês de vida, tem levantado a questão da transmissão perinatal e congénita da infeção³⁶. Embora se presuma que a transmissão horizontal através da saliva de adultos assintomáticos seja a via mais comum de transmissão, a infeção congénita verifica-se em cerca de 1% dos recém-nascidos e é assintomática^{20,23}. A primoinfeção durante a gravidez não é muito comum. No entanto, a reativação do HHV-6 pode ocorrer tão frequentemente como observado no HCMV, sendo a transmissão fetal passível de ocorrer²⁶.

A transmissão vertical também foi sugerida. Dado ter sido detetado DNA do HHV-6B no muco cervical em 19% das grávidas e em 1% no sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos. A reativação do HHV-6 durante a gravidez foi sugerida pelo aumento da frequência de deteção de DNA, tanto no sangue periférico como em exsudados vaginais de grávidas durante o princípio da gestação, essencialmente no terceiro trimestre²³.

Também foram realizados estudos no leite materno, mas não foi detetado DNA do HHV-6, o que indica que a amamentação não faz parte da via de transmissão do vírus, como acontece no HCMV. O HHV-6B também se encontra integrado no genoma das células do sangue periférico, o que sugere uma possível transmissão genética.

1.7 – PATOGÉNESE DO VÍRUS HERPES HUMANO 6

Os herpesvírus podem quebrar as funções imunes e/ou induzir mutações em células infetadas. Sozinhos ou associados a outros vírus, podem transformar células, quando a expressão de genes virais específicos induz mutações no genoma do hospedeiro⁶⁶.

As infeções por roseolovírus provocam alterações significativas no metabolismo das células hospedeiras. A infeção induz o término da síntese de DNA da célula e estimula a

síntese de proteínas virais²⁰.

Tendo em consideração que o HHV-6 apresenta tropismo para uma grande variedade de células e tecidos humanos, torna-se evidente que este vírus pode desempenhar um papel importante na patogénese de variadas doenças¹. Em contrapartida, o facto de ser ubíquo, dificulta a sua associação a doenças.

Na história natural da infeção por HHV-6 podem ser reconhecidas três fases. A primeira é representada por uma infeção primária aguda, em recém-nascidos. A segunda ocorre em crianças e adultos saudáveis. O vírus replica-se nas glândulas salivares e é secretado na saliva (HHV-6B), sem induzir qualquer patologia óbvia, permanece latente em linfócitos, monócitos e persiste em vários tecidos, com uma réplica de baixo nível. Por fim, a terceira fase ocorre com pouca frequência, geralmente em indivíduos imunocomprometidos e está associada à reativação de vírus latentes ou reinfeção¹²⁵.

1.7.1 – INFEÇÃO PRIMÁRIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A primeira doença claramente associada à infeção pelo HHV-6 foi o exantema súbito (*Roseola infantum* ou sexta doença), com um período de incubação de uma a duas semanas, que se caracteriza por febre elevada (superior a 38°C) e desenvolvimento de erupção cutânea específica, após a resolução do estado febril. Apenas uma pequena percentagem de crianças desenvolve o quadro exantemático, a maioria desenvolve unicamente um estado de doença febril curto e indiferenciado^{20, 25, 38}.

Embora usualmente sejam estes os sinais e sintomas do exantema súbito em crianças com infeção por HHV-6, também se verifica raramente uma associação desta doença a determinadas condições neurológicas, nomeadamente, encefalite, meningite e convulsões febris^{12, 21, 41}.

As convulsões febris são condicionadas pela idade e é do conhecimento geral que o HHV-6 pode ser responsável pelas convulsões febris, tendo em conta as propriedades neurotrópicas do vírus^{38, 82}. Por outro lado, alguns estudos defendem que o HHV-6, em geral, não é patogénico, uma vez que se trata de um vírus que reside no cérebro humano, com potencial para a neurovirulência²¹.

Alguns doentes não apresentam a clássica Roséola, levando a diagnósticos diferentes, como otite média, sépsis e meningoencefalites. Muitas crianças são diagnosticadas como tendo sarampo ou outros exantemas, quando na realidade é uma infecção por HHV-6³¹.

A primoinfecção, numa faixa etária mais elevada, é rara e está associada à doença febril indiferenciada, erupções cutâneas e linfocitose atípica²⁰.

Após a infecção primária, o vírus permanece latente em múltiplos locais e pode ocasionalmente reativar sob um estado de imunodeficiência⁸².

1.7.2 – FASE DE LATÊNCIA

A habilidade dos herpesvírus para se tornarem latentes e serem reativados esporadicamente, é uma característica das infecções por esta família. Estes vírus disponibilizam consideráveis recursos genómicos para prevenir a apoptose da célula hospedeira. Para entender a patogénese dos herpesvírus, é importante conhecer quais são as células em que os vírus ficam latentes (PBMC e células do SNC). No caso do HHV-6 suspeita-se que os locais de eleição são o cérebro, a medula óssea, as glândulas salivares e as células do sangue periférico³⁸.

A persistência dos roseolovírus no hospedeiro pode incluir o estado de latência verdadeiro (ausência de produção de vírus infecciosos) e o estado de replicação crónica de baixo nível, com produção contínua e intermitente de viriões novos. Estas duas formas de persistência podem existir no mesmo indivíduo, ocorrendo em locais anatómicos diferentes. A infecção crónica ocorre nas glândulas salivares e no tecido cerebral, enquanto o verdadeiro estado de latência, com episódios de reativação ocorre principalmente em monócitos, macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e células progenitoras de medula óssea²⁰.

Após a infecção primária, o genoma dos herpesvírus permanece latente sob a forma de um episoma circular. As sequências de DNA podem ser detetadas em vários tecidos de indivíduos imunocompetentes assintomáticos, incluindo células mononucleares do sangue periférico, SNC, glândulas salivares, pâncreas, fígado, trato urinário e trato genital feminino^{9,23}. O decréscimo da expressão dos genes virais líticos permite a

estabilização da replicação do genoma viral e consequente ausência de novos viriões infecciosos recém-formados^{9,38}.

A persistência em múltiplos locais, implica uma provável reativação que pode ser associada a várias doenças e à imunodeficiência²⁴. Em hospedeiros imunocompetentes, o HHV-6 pode reativar durante a gravidez ou na coinfeção com HHV-7, HIV, sarampo ou vírus da Dengue⁸².

1.7.3 – INTEGRAÇÃO DO HHV-6 NO CROMOSSOMA HUMANO

Evidências recentes sugerem que o genoma do vírus pode ser integrado no DNA da célula hospedeira, tanto *in vivo* como *in vitro*, nas terminações dos cromossomas 1, 17 e 22, com uma frequência de 0,2-0,8%, podendo ocorrer em células germinativas²³. Estas descobertas são fundamentadas pela presença de sequências teloméricas, nos cromossomas humanos, semelhantes às sequências repetidas na porção terminal do genoma do HHV-6, e pela proteína U94, que funciona como mediador da integração do DNA nas células humanas³⁸.

O HHV-6 integrado no cromossoma (CIHHV-6) foi descrito e quantificado em indivíduos saudáveis. Cerca de 1% dos doadores de sangue têm DNA de HHV-6 integrado no seu genoma¹⁹. O nível de carga viral no sangue total vai desde 10⁶ cópias/ml a 10⁷ cópias/ml¹¹⁹. Assim, as amostras sanguíneas de indivíduos com sequências de HHV-6 integradas nos cromossomas celulares podem apresentar elevada carga viral, mesmo quando estes indivíduos estão saudáveis^{39,122}.

1.7.4 – PROCESSO DE REATIVAÇÃO DO HHV-6

Assim como todos os *Herpesviridae*, após a infeção primária, o HHV-6 tem a capacidade de estabelecer uma infeção latente no seu hospedeiro, que reativa ocasionalmente, o que pode induzir a expressão de novas manifestações clínicas⁵.

A reativação do HHV-6 em adultos imunocompetentes resulta da imunossupressão do indivíduo, podendo ocorrer na gravidez ou em períodos de doença crítica⁴⁰.

O HHV-6 quando latente nas glândulas salivares, PBMC e SNC, pode reativar em indivíduos imunossuprimidos, provocando febre, erupções cutâneas, encefalite, hepatite, supressão da medula óssea e rejeição de órgãos transplantados^{76,122}. Em doentes imunocomprometidos, como em doentes transplantados e doentes com SIDA, a reativação por HHV-6 pode ser sintomática ou assintomática. No primeiro caso, está associada à encefalite, erupção cutânea, febre, pneumonite intersticial, síndrome da bronquiólite obliterante, mielossupressão e doença severa do enxerto-hospedeiro, assim como supressão do mieloenxerto em doentes com transplante de medula óssea³⁹.

A reativação do HHV-6 está geralmente associada à infecção por HCMV ou à rejeição do órgão transplantado. Sendo esta infecção frequentemente reativada entre duas a quatro semanas após o transplante ou no início de uma doença em indivíduos transplantados imunossuprimidos. As reativações de HHV-6B e HHV-6A têm sido detetadas em pacientes transplantados, embora a reativação de HHV-6A seja menos comum⁷³.

Dados recentes sugerem que as citocinas inflamatórias podem desempenhar um papel importante na reativação de HHV-6. As IL-6 (Interleucina-6) e o TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) são produzidos primariamente pelos monócitos e macrófagos, que são os prováveis reservatórios do HHV-6 latente. Assim, sugere-se que há uma associação entre a reativação do HHV-6 e os níveis elevados de IL-6 e TNF- α . Em contrapartida, as células T CD₄⁺ e T CD₈⁺ são expressas em resposta à reativação do HHV-6 e os anticorpos previnem a disseminação de vírus líticos¹²².

Alguns estudos apontam para que a replicação deste vírus possa ser induzida pela apoptose celular. Esta vertente permite explicar os elevados níveis de DNA do HHV-6 no cérebro de doentes com Alzheimer. Deste modo, pode-se assumir que a reativação não é apenas induzida pela imunossupressão do hospedeiro.

Um fármaco que induz a reativação do HHV-6, *in vitro*, é a Amoxicilina. Claramente, a exposição a fármacos é um fator chave na infecção primária, tendo em atenção que as citocinas induzidas por alergia a fármacos podem proporcionar a reativação do HHV-6. Uma vez reativado, este vírus pode contribuir para a Síndrome da Hipersensibilidade Induzida por Drogas (DHIS), levando a um prolongamento do curso da mesma, com resolução lenta, sinais e sintomas recorrentes¹. Esta Síndrome pode ocorrer quando as

células B e a produção de imunoglobulinas permitem a reativação de HHV-6, em conjunto com a presença de células T¹²².

A reinfeção consiste numa infeção com uma nova estirpe de HHV-6 num indivíduo que seja seropositivo para HHV-6. Alguns estudos reportaram o isolamento de mais de uma estirpe de HHV-6 em adultos e crianças, isto indica que pode ocorrer reinfeção³⁸. No entanto, a frequência e a patogenicidade destas infeções exógenas são pouco conhecidas⁵.

1.7.5 – ASSOCIAÇÃO DO HHV-6 A OUTROS QUADROS CLÍNICOS

Os roseolovírus podem ser considerados agentes patogénicos oportunistas, visto que podem persistir assintomaticamente em imunocompetentes, mas podem provocar várias patologias no contexto da imunossupressão²⁰.

O HHV-6 tem sido associado a distúrbios neurológicos, incluindo meningite e encefalite em adultos e crianças imunocompetentes. O HHV-6B é o vírus dominante na infeção de PBML e está relacionado com estados febris epiléticos e a reativação da infeção em imunossuprimidos após transplantação. A elevada prevalência de HHV-6A tem sido associada à esclerose múltipla, tiroidite de Hashimoto, hepatite das células gigantes, síndrome da fadiga crónica, distúrbios neurológicos, linfomas e disfunção imune em imunocomprometidos (indivíduos infetados por HIV e/ou sujeitos a supressão imunológica por fármacos)^{25,51}.

A elevada prevalência da infeção por HHV-6A está associada a Esclerose Múltipla (MS)²⁵. Suspeita-se que existam dois mecanismos pelos quais o HHV-6A provoca MS. A primeira hipótese propõe a reativação do HHV-6A como potencial agente responsável pela autoimunidade e dano tecidual, associado às lesões desenvolvidas na MS. A segunda hipótese visa a interação CD₄₆-HHV-6A, sendo o HHV-6A o responsável pelo processo neuroinflamatório, devido à sua ligação ao recetor celular CD₄₆ durante a infeção^{128,154}.

A infecção ou reativação por HHV-6 em doentes com SIDA é reportada como sendo responsável por doenças severas, nomeadamente pneumonite fatal, encefalite e retinite^{1,19}. O HHV-6 tem sido proposto como cofator na SIDA, pois tanto o HHV-6 como o HIV têm tropismo para o mesmo tipo de células (linfócitos T CD₄⁺). Ambos co-infectam as mesmas células e interagem sinergicamente. Esta interação pode ter relevância biológica, uma vez que o HHV-6 influencia a expressão de vários mediadores imunológicos, como o TNF- α , que ativa a expressão do HIV³⁸. Indivíduos infectados com HIV exibem frequentemente reativação do HHV-6. Alguns estudos defendem que as crianças que adquiriram HIV por transmissão vertical, quando sujeitas à infecção primária por HHV-6, adquirem uma progressão acentuada da doença, durante o primeiro ano de vida. Nestes casos, o HHV-6 pode ser um fator que acelera a progressão para a SIDA, pois o HHV-6 tem tropismo para células T CD₄⁺ e provoca efeitos citopatológicos. A ativação da expressão do HIV, a indução de células T CD₄⁺ e células T CD₈⁺ aumentam a replicação do HHV-6. Concluindo, o HHV-6 pode de facto, promover a progressão da SIDA^{21,51}.

Num modelo *in vivo*, verifica-se que em indivíduos seropositivos para o HIV, a reativação do HHV-6 tem efeitos mínimos na progressão da doença. Em contrapartida, noutros estudos, é demonstrado que há uma repressão da replicação do HIV aquando de uma infecção por HHV-6³⁸.

Apesar da infecção ativa ser frequentemente detetada em indivíduos infectados com HIV, não é claro se o HHV-6 atua meramente como oportunista ou se acelera a progressão da SIDA³⁸.

A infecção do sistema cardiovascular por HHV-6 na infância é raro, apesar de terem sido identificados casos no Japão com HHV-6B¹. Foi sugerido que as células endoteliais e os miócitos poderiam ser reservas importantes do vírus durante a fase de latência e de reativação. Na realidade, parece haver uma correlação entre a infecção do miocárdio e a disfunção arterial em ambas as artérias, coronárias e periféricas^{1,129}. Recentemente também foi descoberto que o gene U94 do HHV-6 consegue inibir a angiogénese *in vitro*. Assim, a infecção do miocárdio por este vírus pode tornar o miocárdio vulnerável à isquémia, aumentando o risco de arritmia e enfarte^{1,19}.

Alguns autores sugerem que o HHV-6, também pode ser um vírus oncogénico. No entanto, os vírus oncogénicos estão restringidos aos gammaherpesvírus (EBV e HHV-8 – herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi). O HHV-6 tem genes capazes de provocar oncogénese, como o gene U95, que tem locais específicos de ligação ao NF- κ B. A desregulação do NF- κ B tem sido postulada como condicionador de cancro, devido aos seus efeitos tanto na via proliferativa, como na via apoptótica¹.

In vitro, o HHV-6 infeta as linhas celulares epidérmicas e as células endoteliais humanas, o que sugere que o HHV-6 possa estar envolvido no desenvolvimento de doenças de pele¹.

1.8 – OBJETIVO DO ESTUDO

O presente trabalho tem como objetivo principal determinar a taxa de infeções pelo HHV-6 num grupo de crianças com o diagnóstico clínico de convulsões febris, através de técnicas de Biologia Molecular, especificamente, PCR em tempo real.

Um objetivo adicional deste estudo refere-se à otimização de uma estratégia que vise melhorar o diagnóstico das infeções primárias pelo HHV-6, recorrendo a técnicas como a avidez das IgG e a determinação da carga viral no sangue total e plasma por PCR em tempo real, além da serologia clássica com deteção e quantificação dos anticorpos IgM e IgG, utilizando técnicas de ELISA e IFA.

Este estudo teve como objetivos secundários a análise da existência de co-infeção entre o HHV-6 e o HCMV, assim como a associação entre o HCMV e a convulsão febril. A pesquisa de HCMV visa a deteção e quantificação do DNA do HCMV efectuada através de duas técnicas de PCR em tempo real, assim como o estudo da serologia para o HCMV e a respetiva avidez das IgG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – DESENHO DO ESTUDO

Para a elaboração deste trabalho foram selecionadas todas as crianças admitidas no serviço de urgência do Hospital D. Estefânia (HDE) - Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC), com febre igual ou superior a 38°C e com o diagnóstico clínico de convulsão febril. A investigação decorreu entre o período de Outubro de 2012 e Julho de 2013, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Central. A participação no estudo foi autorizada, por parte dos doentes, através do consentimento informado, assinado pelos pais das respetivas crianças.

As informações clínicas, nomeadamente, idade, tipo de convulsão, causa e tempo de febre, história familiar de convulsão, sinais e sintomas, foram fornecidas pelo Serviço de Urgência do HDE. Estes dados foram recolhidos para, posteriormente, serem correlacionados com os resultados obtidos no decorrer da investigação.

O serviço de urgência do HDE não teve acesso aos resultados do estudo, sendo que estes foram utilizados apenas para fins de investigação.

2.2 – POPULAÇÃO

A população estudada foi constituída por 49 crianças, com idades compreendidas entre os 4 meses e os 5 anos de idade.

2.3 – AMOSTRAS

As amostras foram recolhidas em tubos secos (com sílica gel), para obtenção de soro, e em tubos de EDTA K3 (Ácido Etilenodiamino tetra-acético tripotássico), para obtenção de sangue total e, posteriormente, de plasma.

A primeira colheita foi realizada à entrada no serviço de Urgência, tendo sido recolhido na fase aguda 48 amostras de soro, 46 de sangue total e 35 de plasma.

A segunda recolha foi realizada cerca de 4 a 8 semanas após o episódio de urgência, tendo sido obtido o soro de 16 crianças. Deste modo, obtiveram-se 16 amostras pares de soro. As restantes crianças faltaram à segunda colheita, tendo sido as amostras de fase aguda analisadas separadamente.

2.3.1 – TRANSPORTE, TRATAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras em tubos secos foram centrifugadas durante 10 minutos a 3600 rpm para obtenção de soro. O soro foi separado para outro tubo e congelado a -80°C.

As amostras em tubos de EDTA K3 foram guardadas a 4°C até à sua deslocação para o Laboratório de Microbiologia, não excedendo as 72 horas após a colheita.

Ambas as amostras colhidas, em tubos secos e EDTA K3, foram transportadas em arcas refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

No laboratório, aos tubos de EDTA K3 foi retirada uma alíquota, correspondente ao sangue total. O restante sangue foi centrifugado a 1500 rpm, durante 10 minutos, de modo a permitir a obtenção de plasma.

As amostras de sangue total, plasma e soro foram conservadas a -80°C em tubos próprios de congelação, corretamente identificados.

2.4 – RESUMO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental deste estudo está esquematizado na figura que segue abaixo. Para a pesquisa de HCMV foram utilizadas as amostras dos doentes em estudo na pesquisa de HHV-6.

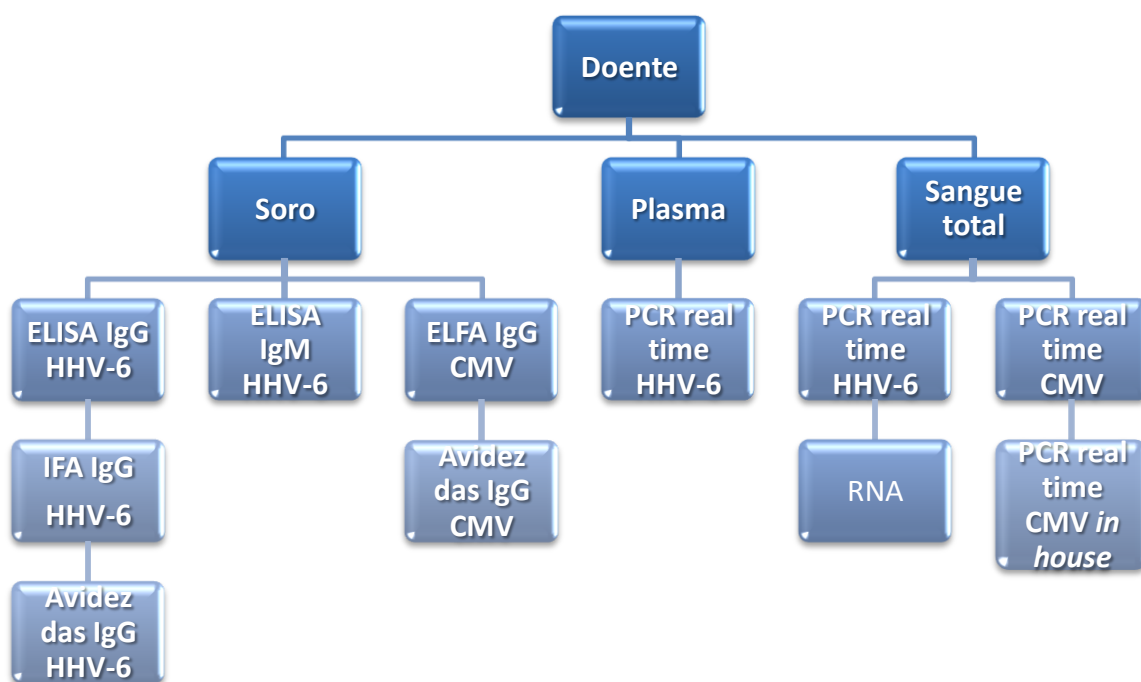


Figura 6 - Esquema da componente prática do trabalho.

2.5 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HHV-6

2.5.1 – SEROLOGIA DO HHV-6

2.5.1.1 – ELISA

A técnica utilizada para a pesquisa de imunoglobulinas IgG e IgM é uma ELISA, utilizando o *kit* Panbio® HHV6 IgG e Panbio® HHV6 IgM (Alere, Massachusetts, Estados Unidos da América) (ver em ANEXO I e II o protocolo da técnica).

Esta técnica consiste num ensaio imunoenzimático (EIA) que se destina à deteção qualitativa dos anticorpos da classe das IgG e IgM de HHV-6 no soro humano.

A pesquisa de IgM anti-HHV-6 auxilia no diagnóstico laboratorial clínico da infeção primária ou infeção por HHV-6 reativada em pacientes que apresentem sintomas clínicos consistentes com a infeção por HHV-6.

Esta técnica de pesquisa de IgG do HHV-6 auxilia no diagnóstico clínico laboratorial de pacientes com exposição recente ou passada ao HHV-6.

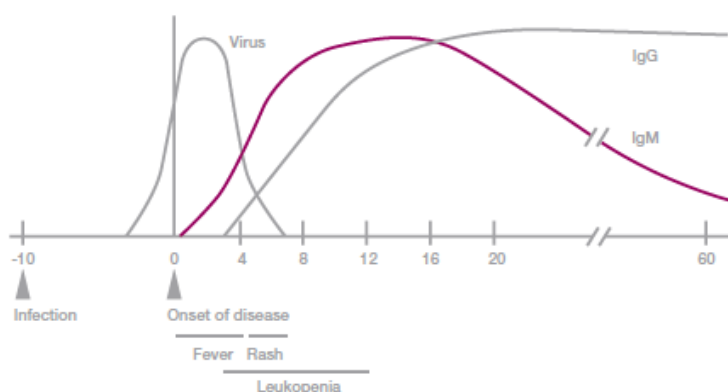


Figura 7 - Tempo de resposta imunitária após infeção por HHV-6.

Quando os anticorpos para o antígeno do HHV-6 estão presentes no soro do paciente, combinam-se com os antígenos de HHV-6 que revestem a superfície de poliestireno dos micropoços. O soro residual é removido por lavagem e adiciona-se a peroxidase

conjugada com anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humanos, consoante o *kit*. Os micropoços são lavados e o substrato é adicionado, tetremetilbenzidina/peróxido de hidrogénio (Cromogéneo TMB incolor). O substrato é hidrolisado pela enzima e o cromogéneo muda para a cor azul. Por fim, adiciona-se ácido de modo a que a reação pare, o TMB muda para amarelo. O desenvolvimento de cor é indicativo da presença de anticorpos IgM ou IgG do HHV-6 no teste da amostra.

2.5.1.2 – AVIDEZ

Para determinar se a presença de IgG anti-HHV-6 corresponde a uma infeção recente ou passada, realizou-se o estudo das IgG por ELISA (com base no kit acima referido), de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido apenas alterado um passo: substituição da solução de lavagem do primeiro passo de lavagem por uma solução de ureia. Foram testadas três concentrações diferentes (3 M, 6 M e 8 M). Com base na literatura e tendo sido semelhantes os resultados das três concentrações testadas, optou-se por realizar a avidéz das IgG anti-HHV-6 com a solução de ureia de concentração 8 M. Neste ensaio, a imersão do complexo antigénio-anticorpo com a solução contendo ureia (8 M) permite a libertação de anticorpos de baixa avidéz, mantendo aqueles cuja avidéz é elevada.

O índice de avidéz é calculado do seguinte modo:

$$\text{Avidéz} = \frac{\text{Absorvância da amostra com lavagem com solução de ureia}}{\text{Absorvância da amostra sem lavagem com solução de ureia}} \times 100\%$$

2.5.1.3 – IFA

Para confirmação da presença de IgG obtidas pela técnica de ELISA, foi utilizado o *kit Biotrin Human Herpesvirus-6 IgG IFA*, Diasorin, Saluggia, Itália. Este ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) destina-se a detetar anticorpos IgG do HHV-6 no

soro. A técnica foi elaborada de acordo com as instruções do fabricante (ver ANEXO III).

Esta técnica utiliza o método de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos por determinação qualitativa. As amostras do soro dos doentes são incubadas com o antígeno HHV-6 imobilizado, previamente estabilizado numa lâmina de vidro. Se os anticorpos de IgG de HHV-6 estiverem presentes na amostra, forma-se um complexo estável com o antígeno. O anticorpo ligado reage com um IgG anti-humano de cabra conjugado com fluoresceína. Este complexo é visualizado com um microscópio fluorescente. Uma reação positiva de anticorpo denota-se por fluorescência verde brilhante.

2.5.2 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA HHV-6

2.5.2.1 – EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração do DNA viral no sangue total e plasma, foi utilizado o *Kit* de Purificação *JetQuick® Genomic DNA*, Genomed, Löhne, Alemanha. A técnica foi elaborada de acordo com as instruções do fabricante (ver ANEXO IV).

Esta técnica consiste na obtenção de DNA genómico através das várias fases de tratamento da amostra:

1. Preparação do Lisado – Esta fase compreende a minimização das possíveis interferências durante a obtenção de DNA puro, através dos seguintes processos:
 - a. Desnaturação das proteínas com um tampão de lise celular;
 - b. Digestão enzimática das proteínas desnaturadas e libertação do DNA genómico das proteínas a ele ligadas com Protease *Genomed* (20 mg/ml);
 - c. Digestão do RNA residual com a RNase A (20 mg/ml);
2. Fixação do DNA genómico na membrana de sílica – Esta fase consiste na passagem do lisado por uma coluna com membranas de sílica permitindo a ligação do ácido nucleico à sílica.

3. Purificação do DNA genómico – Nesta fase são utilizados duas soluções de lavagem que permitem a eliminação das impurezas da coluna e outros contaminantes presentes no lisado;
4. Eluição do DNA genómico – Este processo engloba a passagem de 10 mM Tris-HCl pH=8,5, uma solução que liberta o DNA genómico da membrana de sílica.

No final deste processo obtém-se DNA genómico que deverá ser armazenado a -20°C.

Para garantir que as amostras foram extraídas corretamente, foi realizado a cada sessão de extração um controlo negativo e um controlo positivo, que consiste na substituição da amostra (sangue total ou plasma) por água destilada e IC2, respetivamente.

2.5.2.2 – KIT PCR REAL TIME CMV HHV6,7,8 R-GENE™

A pesquisa de DNA de HHV-6 foi efetuada recorrendo ao *kit CMV HHV6,7,8 R-gene™*, ref.:69-100, Argene, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França. Nesta técnica é detetado DNA de HHV-6 através da pesquisa do gene U57, cujo fragmento amplificado tem 116pb de tamanho. O seu limite de deteção é de 156 cópias/ml. A técnica foi elaborada de acordo com o protocolo do fabricante (ver ANEXO V), com uma modificação. O controlo interno utilizado nesta técnica foi o *DICO Ampli* (indicado pela casa comercial).

O equipamento de amplificação em tempo real utilizado foi o *Applied Biosystems 7500*, visto ser compatível com este *kit*.

A gama de quantificação é linear de 500 cópias/ml a 10^7 cópias/ml. Os resultados são expressos em número de cópias de DNA de HHV-6 por ml de sangue total ou plasma. O número de cópias de DNA foi determinado tendo em conta o valor de *Ct* (*Thresold cycle*), que representa o ciclo a partir do qual é detetada fluorescência na amostra, correspondendo assim ao ponto onde a curva de amplificação da amostra atinge a base de referência de fluorescência emitida.

A quantificação decorre através da técnica das sondas de hidrólise 5' nuclease. As misturas de amplificação estão prontas a serem usadas, contêm dNTPs, tampão de amplificação, Taq Polimerase, sondas de cada um dos parâmetros virais, assim como as sondas específicas do controlo interno (IC2).

O controlo interno da amplificação de DNA por PCR em tempo real (*DICO Ampli*) tem como objetivo validar os resultados obtidos na amplificação em tempo real e permitir a deteção da presença de agentes inibidores na amostra extraída. A possível presença de inibidores da amplificação, pode provocar uma interpretação errada dos resultados, devido à análise de falsos negativos. De modo a esclarecer estes resultados, as amostras de DNA extraído são testadas simultaneamente com a *premix DICO R-gene*, em cada corrida. A análise dos resultados obtidos com este controlo permite concluir se o DNA extraído contém ou não agentes inibidores.

Os resultados são validados com base no controlo de extração, inibição e controlo negativo, fornecidos no *kit*.

2.5.3 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA DO HHV-6

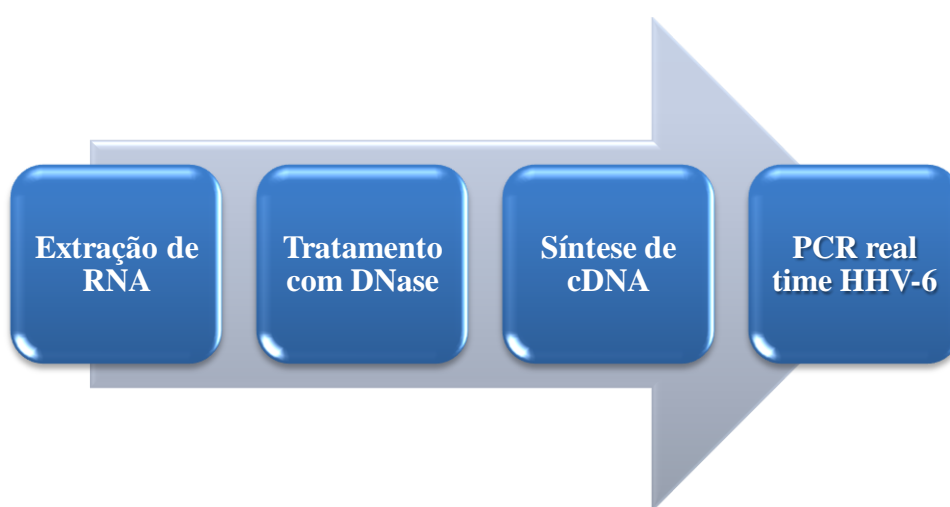


Figura 8 - Resumo esquemático da síntese à deteção de RNA de HHV-6.

2.5.3.1 - EXTRAÇÃO DE RNA

O processo de extração de RNA total realizou-se com recurso ao *kit MinElute Virus Spin, QIAamp®*. O procedimento decorreu de acordo com o protocolo do fabricante (ver ANEXO VI).

2.5.3.2 - TRATAMENTO COM DNASE

Tratou-se o extrato de RNA total com DNase recorrendo ao *kit* comercial *Turbo DNAFree™*, Ambion, para remover a contaminação de DNA genómico (ver o protocolo da técnica em ANEXO VII).

2.5.3.3 - SÍNTESE DE CDNA

A síntese de cDNA foi realizada recorrendo a um *hexaprimer* (Roche), dNTP's (Invitrogen) e ao *kit* comercial *SuperScript III* – Invitrogen. O protocolo utilizado foi o aconselhado pelo fabricante (ver ANEXO VII).

2.5.3.4 – QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Para a deteção de RNA de HHV-6, utilizou-se o *kit CMV HHV6,7,8 R-gene™*, ref.:69-100, Argene, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França, de modo igual à técnica realizada com DNA de HHV-6 extraído e de acordo com as instruções do fabricante (ver ANEXO V).

2.6 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HCMV

Para o diagnóstico laboratorial da infeção por HCMV foram realizadas duas técnicas de PCR em tempo real, uma comercial e outra *in house*, assim como a pesquisa de IgG para o HCMV e a respetiva avidéz.

2.6.1 – DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA HCMV

Após a determinação do HCMV pela técnica de PCR em tempo real *in house*, recorreu-se à técnica de PCR em tempo real comercial (Argene), com o intuito de comparar os resultados e determinar a carga viral no sangue total dos doentes.

2.6.1.1 – PCR REAL TIME *IN HOUSE*

A técnica de PCR em tempo real *in house* foi efetuada de acordo com o protocolo adotado pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa. Para o procedimento foram utilizados uma sonda e *primers* específicos para o gene UL83 (283 pares de bases), que codifica a fosfoproteína pp65 do genoma do HCMV. Esta técnica consiste na determinação da presença de DNA de HCMV pela pesquisa do gene UL83, com o seguinte procedimento:

1. Proceder à realização de uma mistura total de reação de 25 µl, sendo que 20 µl correspondem à *mix* desta técnica e 5 µl ao volume da amostra. Nesta reação utilizam-se os seguintes reagentes para constituição da *mix* (tendo em atenção a concentração de stock dos *primers* e da sonda, que é de 100 µM):
 - *TaqMan Universal PCR Master Mix* (2x);
 - *Primers* HCMV (100 µM):
 - HCMV F: 5'-CCC TCG GGC AAG CTC TTT-3'
 - HCMV R: 5'CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA-3'

- Sonda CMV (10 μ M) – 5'-TGC ACG TCA CGC TGG-3', marcada em 5' com 6-carboxy-fluorescein como repórter e em 3' com *minor groove* como *quencher*;
 - Água até perfazer os 20 μ l de volume total.
2. Para a realização da curva padrão utiliza-se a AD169 quantificada pelo *kit* comercial. O ponto de referência de maior concentração na curva corresponde a uma diluição de 1:100 da AD169, com uma concentração final de 1250 000 cópias de DNA de HCMV/ml. Os dois pontos seguintes utilizados são diluições seriadas de 1:10 desta diluição da AD169;
 3. Como controlo interno de cada amostra utiliza-se 2 μ l da primeira diluição de 1:10 da AD169. Se ocorrer inibição pela amostra, não ocorrerá qualquer amplificação do controlo interno;
 4. No equipamento de PCR em tempo real *in house* (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems), o ciclo de amplificação é o seguinte:
 - a) 1 Ciclo a 50°C durante 2 minutos;
 - b) 1 Ciclo a 95°C durante 10 minutos;
 - c) 50 Ciclos a 95°C durante 15 segundos;
 - d) Hibridação/extensão a 60°C durante 1 minuto.

Os resultados das amplificações foram analisados informaticamente através do “ABI Prism 7000 SDS Software” – Versão 1.1 (Applied Biosystems).

Neste estudo, de modo a interpretar os resultados de uma forma quantitativa, utilizou-se a quantificação absoluta, ou seja, a quantidade do produto de amplificação baseia-se na comparação da intensidade da fluorescência com uma curva-padrão ou curva de calibração, desenhada a partir de várias diluições com quantidades de DNA viral conhecidas.

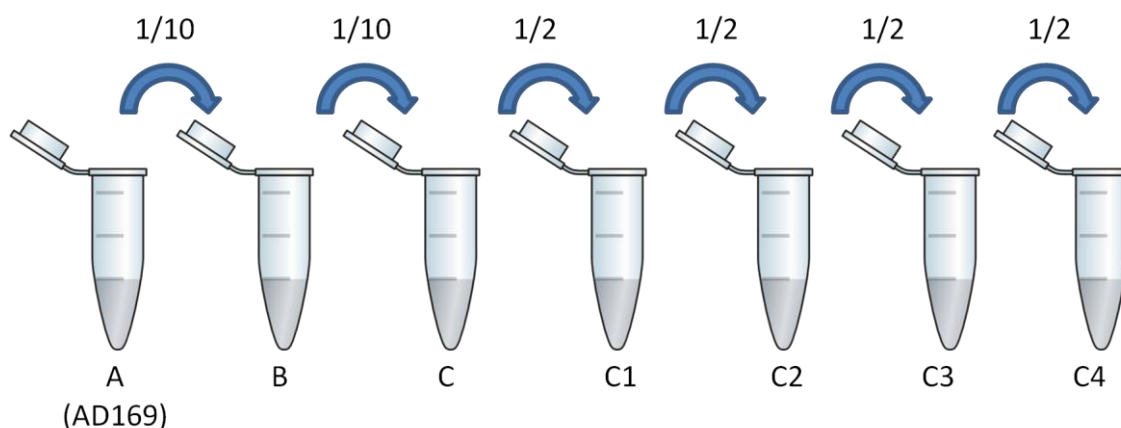


Figura 9 - Diluições seriadas para preparação de padrões e calibradores para a técnica de PCR em tempo real *in house*.

Para a construção da curva de calibração foi utilizado um extraído da AD169 com uma concentração de DNA de HCMV previamente conhecida, a partir do qual foram realizadas diluições seriadas para a preparação dos padrões e calibradores.

Os resultados positivos foram obtidos por extrapolação dos valores de *Ct*. Desta forma, os valores de *Ct* determinados para cada amostra são equiparados com os valores de *Ct* da curva de calibração, fazendo corresponder a um valor aproximado de concentração de DNA de HCMV. Os resultados quantitativos finais foram expressos em cópias/ml.

Como medidas de controlo por sessão de PCR em tempo real foram utilizados controlos negativos e controlos positivos, que consistiram respetivamente, na substituição dos extraídos por água destilada e de extraídos da estirpe AD169.

2.6.1.2 – KIT PCR REAL TIME CMV HHV6,7,8 R-GENE™

O kit *CMV HHV6,7,8 R-gene™*, ref.:69-100, Argene, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França, permite quantificar a carga viral do HCMV, pela pesquisa do gene UL83 no sangue total, que apresenta um fragmento amplificado com tamanho de 283 pb. O seu limite de deteção é de 50 cópias/ml. A técnica foi elaborada de acordo com o protocolo do fabricante (ver ANEXO IX), com uma alteração, o controlo interno não foi

realizado, pois foi previamente executado na técnica anterior de PCR em tempo real *in house*.

2.6.2 - SEROLOGIA HCMV

2.6.2.1 – ELISA E AVIDEZ

Para determinar se o doente esteve anteriormente em contacto com o vírus HCMV fez-se a determinação quantitativa das IgG específicas para o HCMV, pelo *kit* IgG CMV-técnica *Enzyme Linked Flourescent Imunoassay*, realizada no equipamento *Vidas* (bioMérieux). Os resultados inferiores ao valor de 4 U/ml foram considerados como negativos e os superiores a 6 U/ml foram definidos como positivos (estas determinações foram efetuadas no Laboratório Central da LabCo – Lisboa).

Para a determinação da avidéz, foram usados dois testes VIDAS HCMV. O primeiro serve como teste de referência. No segundo, o tampão de lavagem é substituído por um tampão contendo ureia 6 M. O índice de avidéz é determinada pelo cálculo da relação entre o resultado obtido com o ensaio de referência e o resultado obtido com a tira contendo ureia. De acordo com o fabricante, um índice maior ou igual a 65% permite a exclusão de uma infeção primária.

3. RESULTADOS

3.1 – DADOS GERAIS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Entre o período de Outubro de 2012 e Julho de 2013 participaram neste estudo 49 crianças, que recorreram ao serviço de urgência do Hospital D. Estefânia com quadro clínico de convulsão febril. Destes doentes, foram obtidas na fase aguda 48 amostras de soro, 46 de sangue total e 35 de plasma. Numa segunda colheita, 4 a 8 semanas após a primeira fase, recolheram-se 16 amostras de soro.

Das 49 crianças em estudo, 69% eram do sexo masculino e as restantes do sexo feminino (31%), com uma média de idade de 2 anos (24 meses), compreendida entre os 4 meses e os 5 anos (Gráficos 1 e 2).

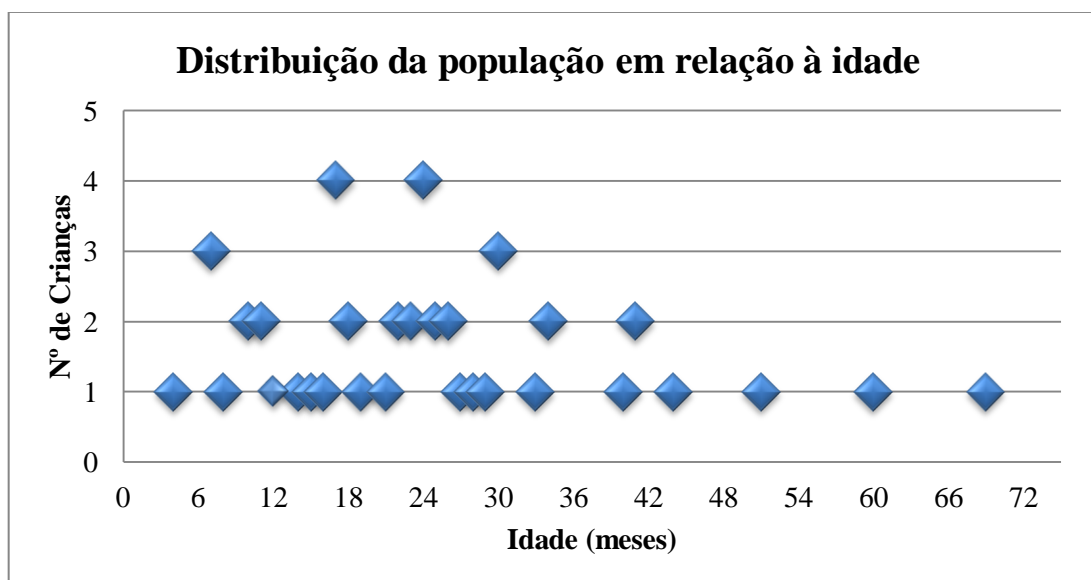


Gráfico 1 - Distribuição da população em relação à idade.

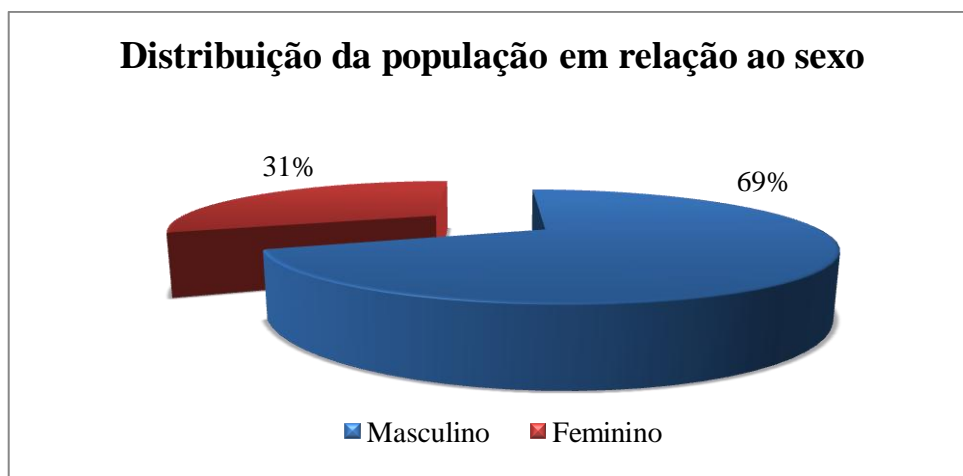


Gráfico 2 - Distribuição da população em relação ao sexo.

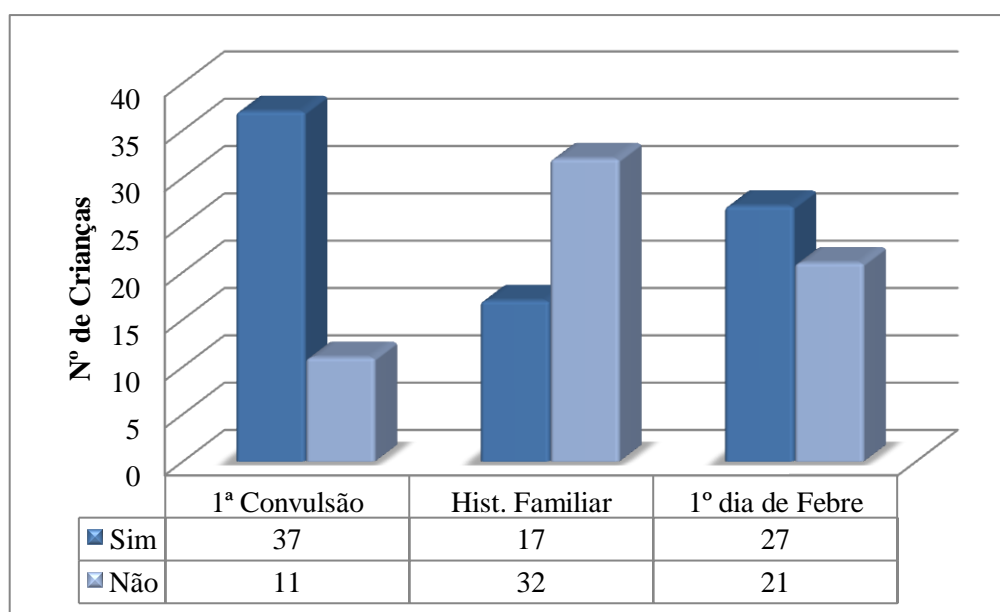


Gráfico 3 - Distribuição dos dados clínicos da população estudada pelas categorias: primeira convulsão, antecedentes familiares de convulsão e ocorrência de convulsão febril no primeiro dia de febre.

As causas de febre na população em estudo foram variadas, na maioria dos casos a causa de febre foi a infecção respiratória em 33% dos casos. O Exantema súbito verificou-se em 2% e a infecção por HCMV em 4%.

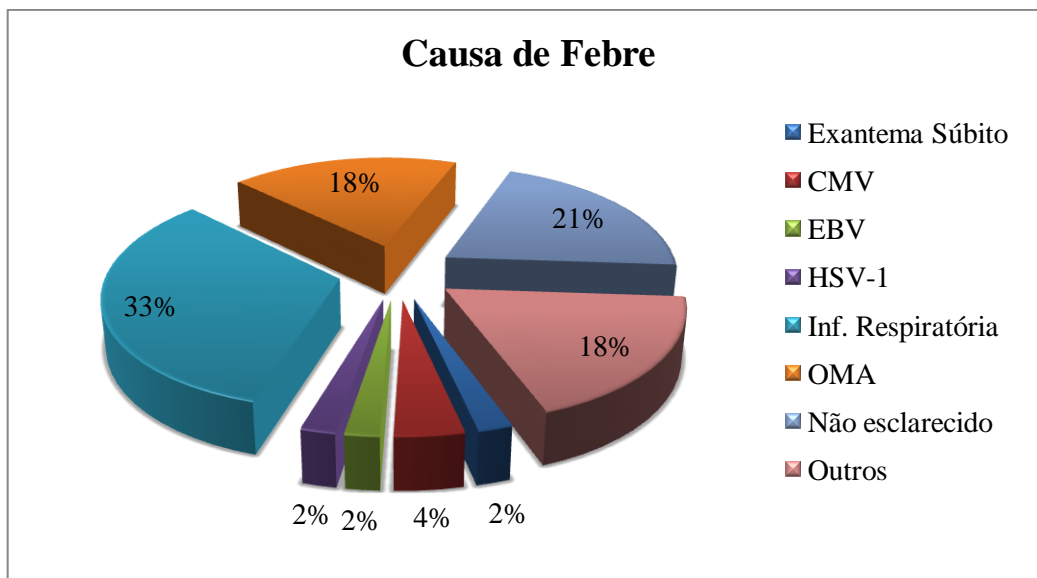
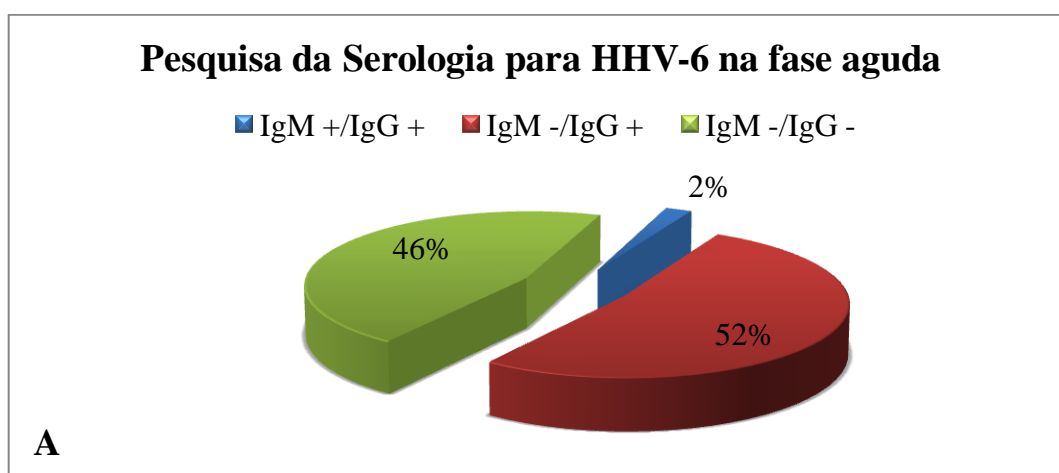


Gráfico 4 - Frequência das várias causas de febre na população em estudo.

3.2 – RESULTADOS DO ESTUDO DO HHV-6

3.2.1 – SEROLOGIA PARA HHV-6

Como era esperado, a maioria da população apresentou serologia positiva para o HHV-6. No entanto, das 48 amostras recolhidas na fase aguda, apenas uma apresentou IgM anti-HHV-6 (2%). Na segunda colheita, foram obtidas 16 amostras de soro, que foram sujeitas à pesquisa de IgG e IgM anti-HHV-6.



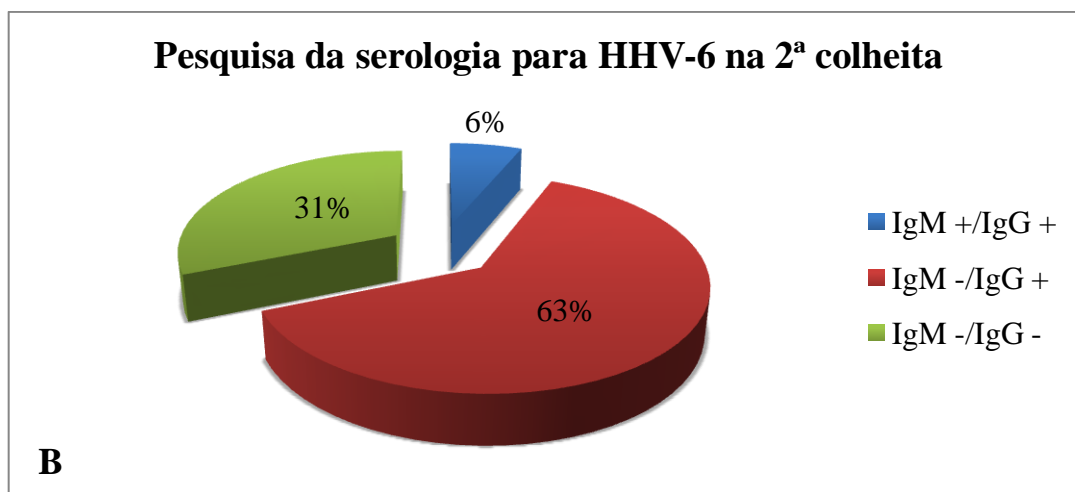


Gráfico 5 - Resultados da pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-HHV-6 em todas as crianças que deram entrada no serviço de urgência do HDE (A). Resultados da serologia na segunda colheita (B).

Os resultados obtidos na técnica de ELISA foram confirmados por IFA, dado que a segunda técnica tem maior sensibilidade e especificidade que a primeira.

Em primeira análise, verificou-se um caso de seroconversão (doente 24). Para confirmação dos valores obtidos por ELISA, utilizou-se a técnica IFA tanto no soro de fase aguda como no soro obtido na segunda colheita. O resultado de ambos os ensaios no soro da colheita de fase aguda foi concordante, no entanto divergiu no soro da segunda colheita.

Na segunda colheita obtiveram-se 16 amostras positivas para IgG e 1 para IgM (a mesma que apresentou resultado positivo na fase aguda).

Além das 48 amostras das crianças em estudo, realizou-se paralelamente o estudo de 3 amostras de soro fornecidas pelo INSA (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos na técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-HHV-6, nas amostras fornecidas pelo INSA.

	IgG anti-HHV-6	Avidez das IgG
A1	+	77%
A2	-	
A3	+	72%

Com o intuito de apurar qual a diluição de amostra e qual a concentração de ureia (3M, 6M e 8M) mais adequadas ao estudo da avidéz, utilizou-se uma das amostras fornecidas pelo INSA (Tabela 4). Para todas as amostras de soro foi determinada a avidéz com base nos seguintes parâmetros: fator de diluição da amostra de 1:101 e concentração da solução de ureia de 8 M.

Tabela 4 - Análise da avidéz das IgG para o HHV-6 com a variação da concentração de ureia e diluição da amostra A1.

Concentração de Ureia	Amostra (Diluição 1/50)	Amostra (Diluição 1/100)	Amostra (Diluição 1/200)
[8M]	85%	76%	73%
[6M]	74%	87%	76%
[3M]	86%	81%	

O estudo da avidéz das IgG para o HHV-6 revelou que nenhuma criança apresentava IgG de baixa afinidade, ou seja, em todos os caso a avidéz é superior a 70%.

Tabela 5 - Resultados da avidéz das IgG anti-HHV-6 em comparação com os resultados obtidos na técnica de IFA.

Amostras	Avidéz	IFA	Amostras	Avidéz	IFA
4	72%	+++	25	100%	++
6	86%	++++	26	79%	
7	84%	+	29	96%	
9	90%	++	31	100%	++
11	86%		33	85%	++++
12	87%	+++	36	79%	
13	92%	+++	37	100%	+++
14	85%	+++	40	88%	
18	81%	++	42	100%	+
19	96%	+	44	100%	++
21	72%	+++	46	77%	++
22	85%	+++			

3.2.2 – CARGA VIRAL DO HHV-6

Das 46 amostras estudadas, a frequência de amostras positivas no sangue total foi de 48%, o que corresponde a 22 amostras positivas e 24 negativas. No plasma, foram consideradas positivas apenas 6 amostras (17%).

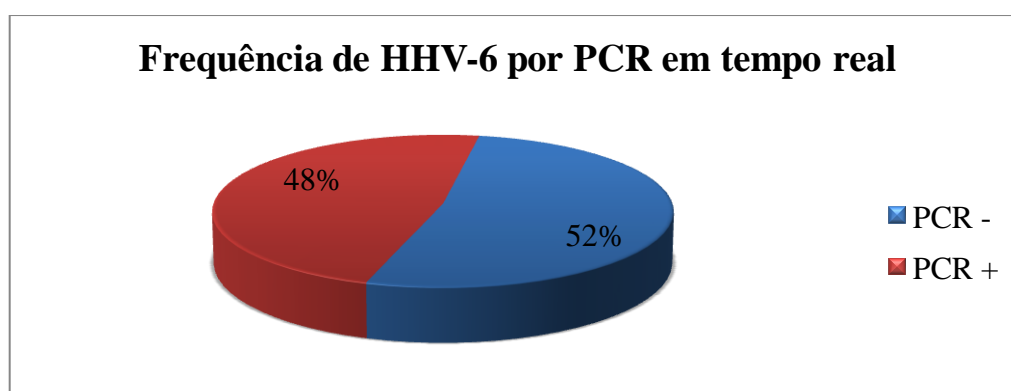


Gráfico 6 - Frequência das amostras positivas e negativas para HHV-6 por PCR em tempo real na população estudada

Para a detecção de DNA de HHV-6 foi realizada em simultâneo a técnica de PCR em tempo real com o *kit* CMV HHV6,7,8 R-gene™, tanto nas amostras de sangue total como de plasma (ANEXO XI).

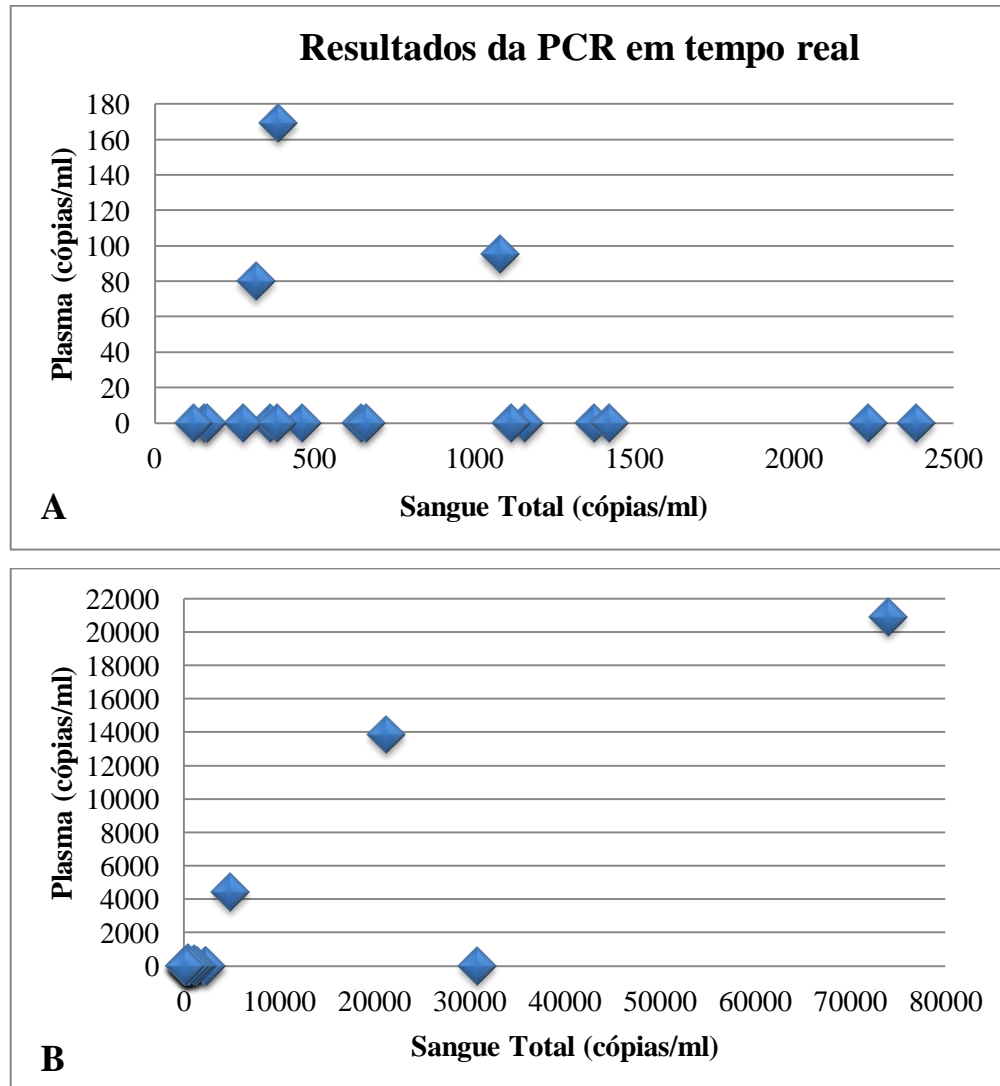


Gráfico 7 - Relação e distribuição dos resultados obtidos na técnica de PCR em tempo real, nas amostras de sangue total e plasma que foram estudadas em simultâneo. Valores inferiores a 5000 cópias/ml (**A**). Valores superiores a 5000 cópias/ml (**B**).

Com base nos 35 plasmas obtidos, detetaram-se 6 com carga viral positiva para HHV-6. Destes 6 positivos, 2 eram casos de infeção primária por HHV-6.

Quando comparados com o sangue total, verificámos que o plasma apresenta maior valor preditivo positivo (VPP=33%) que o sangue total (VPP=18%). Uma vez que neste último, apenas foram detetados 4 casos de infeção primária em 22 amostras com carga viral positiva para o HHV-6.

Para averiguarmos se a deteção de carga viral no sangue total é mais sensível do que a deteção no plasma recorreu-se ao estudo estatístico, especificamente ao Teste Exato de Fisher (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados obtidos na técnica de PCR em tempo real, em crianças cujas amostras de sangue total e plasmas foram simultaneamente estudadas. $p = 0,005$ (*Teste Exato de Fisher*).

		Sangue total	
		Positivo	Negativo
Plasma	Positivo	6	0
	Negativo	10	19

3.2.3 – PESQUISA DE RNA DO HHV-6

Para detetarmos se o HHV-6 estava a replicar, fomos verificar se havia produção de mRNA nas amostras em estudo. Esta pesquisa foi realizada em apenas 15 das 22 amostras com carga viral para HHV-6, devido à limitada quantidade de amostra. Para verificarmos a existência de mRNA, foi necessário converter mRNA em cDNA.

Este procedimento foi previamente testado com uma amostra positiva para HCMV (primoinfeção). Neste caso, a pesquisa de RNA realizou-se através da técnica de PCR em tempo real *in house*, em substituição da técnica de PCR comercial.

O resultado da pesquisa de RNA de HHV-6 foi negativo para todas as amostras em estudo (Figura 6). Por suspeita de excesso de amostra, motivo que poderia provocar inibição da reação, realizou-se uma nova PCR, utilizando menor quantidade da amostra inicial de cDNA. Tendo em conta o número limitado de testes do *kit* CMV HHV6,7,8

R-gene™, fez-se esta nova pesquisa apenas em 7 amostras. O resultado obtido nestes casos foi igualmente negativo.

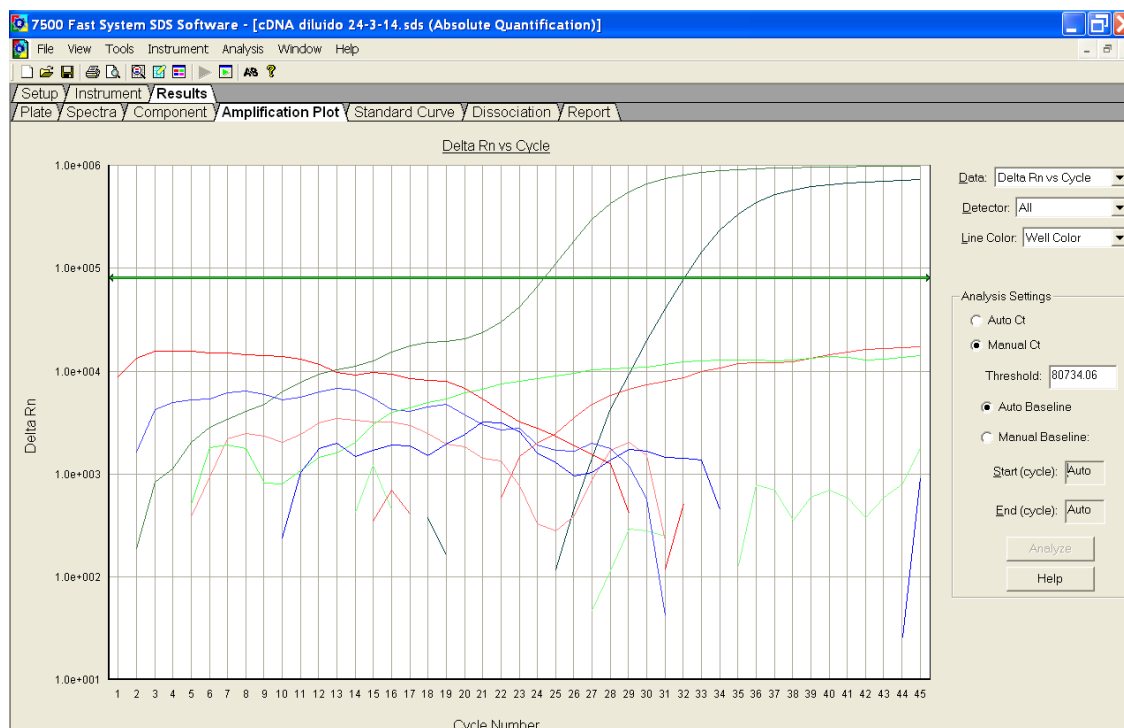


Figura 10 - Resultados da pesquisa de RNA de HHV-6 por PCR em tempo real.

3.2.4 – RELAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL E A SEROLOGIA DO HHV-6

Com base na análise conjunta destes resultados para o HHV-6 podemos resumir os dados obtidos do seguinte modo:

- 4 das 45 crianças apresentaram PCR positiva com serologia negativa na primeira colheita;
- 18 das 45 crianças apresentaram PCR e IgG positivas, uma delas com IgM positiva;
- 5 das 45 crianças tiveram apenas IgG positivas com PCR negativas;
- 18 das 45 crianças tiveram resultado negativo tanto para a serologia como para a carga viral;
- 3 das 48 crianças tiveram IgG positiva, mas não realizaram PCR e a 1 criança não se fez a serologia, apenas a PCR, que apresentou resultado negativo.

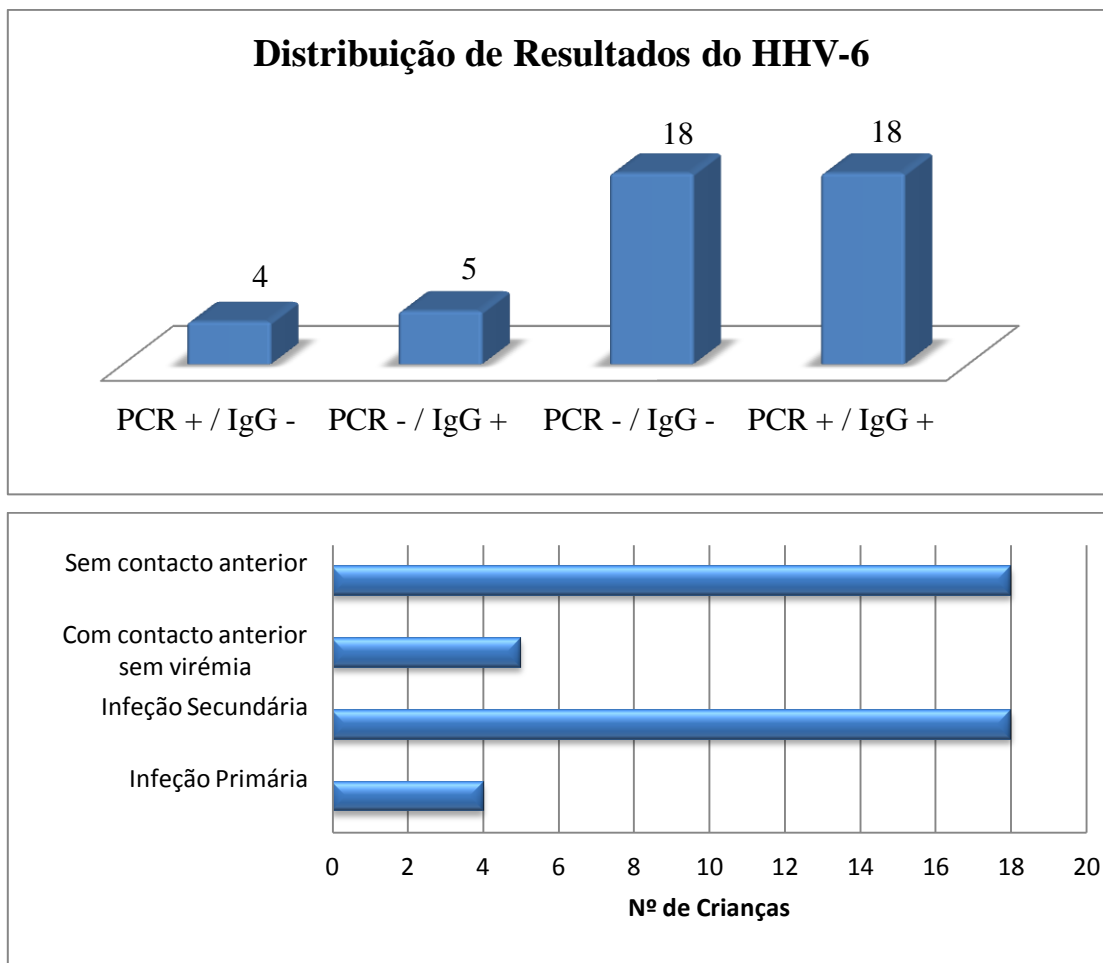


Gráfico 8 - Resultados obtidos para o HHV-6 com base nas técnicas de serologia e PCR em tempo real.

3.3 – RESULTADOS DO ESTUDO DO HCMV

3.3.1 – CARGA VIRAL DO HCMV

A pesquisa de DNA de HCMV foi realizada nas 46 amostras de sangue total deste estudo, através da técnica de PCR em tempo real *in house*, tendo sido detetado em 15% da população (7 crianças). Para confirmação e quantificação foi utilizado o *kit* CMV HHV6,7,8 R-gene™ (Tabela 7).

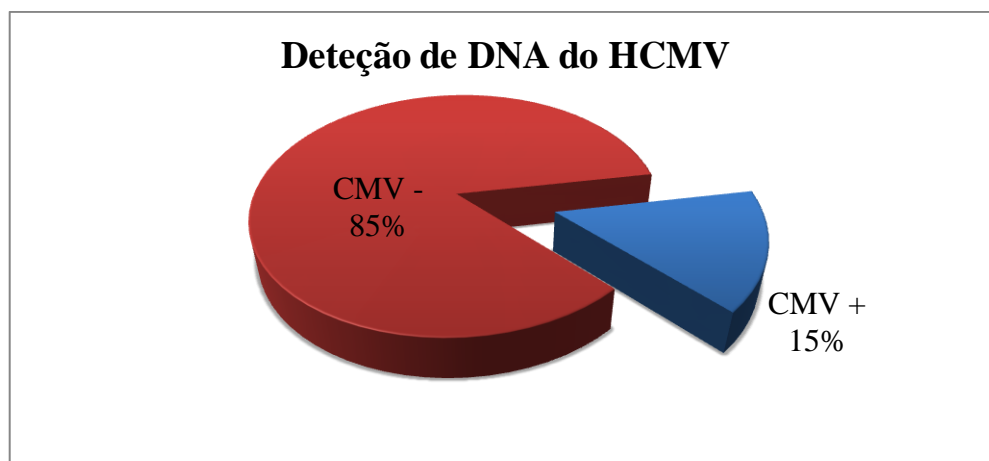


Gráfico 9 - Prevalência de HCMV na população em estudo.

Tabela 7 - Relação do número de cópias/ml de DNA de HCMV obtido em ambas as técnicas de PCR em tempo real, comercial e *in house*.

Amostra	PCR <i>in house</i> (cópias/ml)	PCR Argene (cópias/ml)
5	32 325	115 219
7	499	0
8	1 311	5 464
20*	314	163
33	1 000	2 101
39	1 852	2 694
48	1 398	2 510

*Devido ao baixo volume de amostra, a segunda extração foi realizada com metade do volume aconselhado pelo *kit* (100 µl de sangue total).

3.3.2 – SEROLOGIA PARA O HCMV

Na determinação de IgG anti-HCMV e da respetiva avidéz foram estudadas apenas as amostras de soro, cujas amostras de sangue total apresentavam carga viral do HCMV. Os resultados desta pesquisa foram obtidos no equipamento VIDAS, através de um kit comercial.

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos na serologia do HCMV, nomeadamente anticorpos IgG anti-HCMV e respetiva avidéz.

Amostras	IgG anti-HCMV (Ua/mL)	Avidéz
5	49	48%
7	53	90%
8	56	81%
20	68	80%
33	35	18%
36	86	85%
39	63	52%
48	161	

Verificou-se nestas amostras que a maioria apresentou IgG com elevada avidéz. Em duas amostras cuja avidéz sugere provável infeção recente (48% e 52%) e apenas uma amostra apresentou avidéz de 18%. Este último corresponde a uma infeção recente por HCMV, pois valores de avidéz inferiores a 40% indiciam a presença de uma infeção primária por HCMV.

3.4 – RELACÃO ENTRE O HHV-6 E O HCMV

De modo a averiguar se a infeção por HHV-6 e HCMV estão relacionadas, recorreu-se ao Teste Exato de Fisher. Este teste permitiu verificar que a infeção por HCMV e a infeção por HHV-6 são variáveis independentemente (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos para a deteção de HHV-6 e HCMV. $p > 0,05$ (Teste Exato de Fisher).

		HHV-6	
		Positivo	Negativo
HCMV	Positivo	4	3
	Negativo	18	21

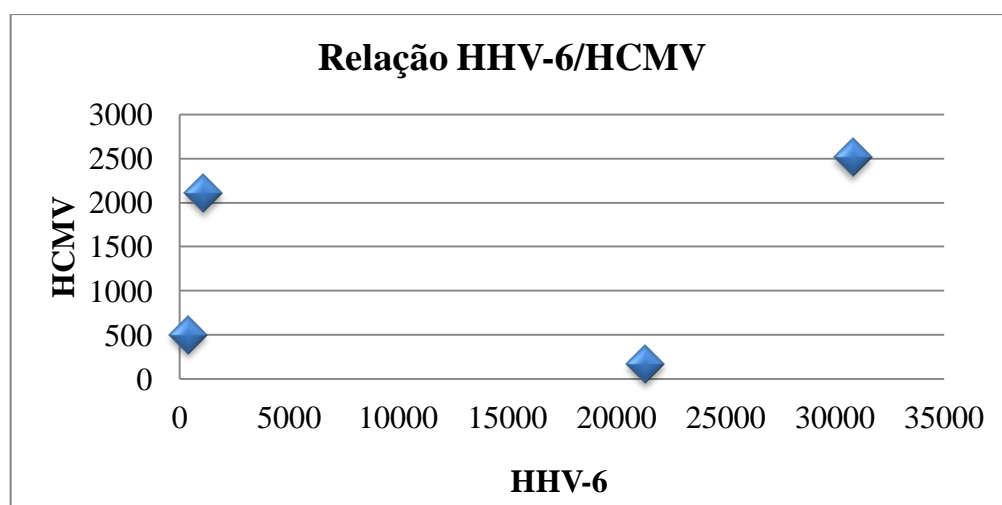


Gráfico 10 - Distribuição da carga viral aquando da presença de ambos os vírus.

Tabela 10 - Relação entre o número de cópias/ml de DNA (*kit* CMV HHV6,7,8 R-gene™) de ambos os vírus e a respetiva serologia e avidéz.

Amostra	Carga Viral		Serologia		Avidéz	
	HHV-6 (cópias/ml)	HCMV (cópias/ml)	IgG anti- HHV-6	IgG anti- HCMV	HHV-6	HCMV
5	0	115 219	-	+		48%
7	363	499*	+	+	84%	90%
8	0	5 464	-	+		81%
20	21 291	163**	-	+		80%
33	1080	2 101	+	+	85%	18%
39	0	2 694	-	+		52%
48	30 800	2 510	-	+		

* Quantificado por PCR em tempo real *in house*.

** A extração foi realizada com 100 µl, metade volume aconselhado pelo *kit*.

Em relação à idade, não foi possível estabelecer nenhuma ligação entre a infeção por HHV-6 ou HCMV com a idade das crianças em estudo (Gráfico 11).

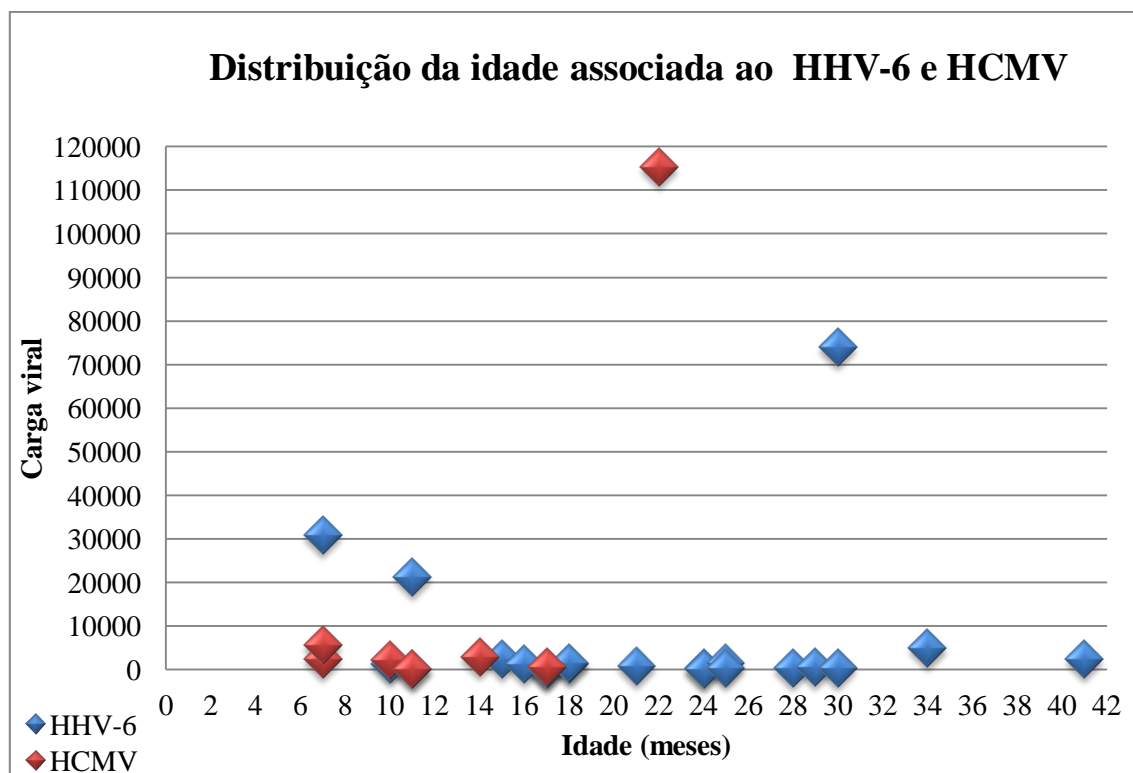


Gráfico 11 – Distribuição dos casos do DNA de HHV-6 e/ou HCMV positivos em relação à idade.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

De acordo com o referido na introdução, os objetivos deste trabalho relacionavam-se com a determinação da taxa de infecção por HHV-6 num grupo de crianças com o diagnóstico clínico de convulsões febris e a pesquisa e quantificação de HCMV no mesmo grupo. O procedimento experimental descrito neste estudo teve como objetivo encontrar uma metodologia que permita a otimização da detecção da infecção por HHV-6.

O presente estudo esteve centrado no diagnóstico da infecção por HHV-6 na convulsão febril, implicando a recolha de sangue no dia da entrada no serviço de urgência. Em alguns casos também foi realizada uma segunda colheita 4 a 8 semanas após o episódio de urgência, de modo a averiguar a possível existência de casos de seroconversão. Ambas as amostras foram paralelamente testadas por técnicas serológicas.

Inicialmente incluíram-se neste estudo 49 crianças, não se tendo conseguido realizar um estudo de fase aguda completo em 4 crianças. Isto deve-se ao facto de apenas ter sido fornecido um dos tubos necessários para este estudo, tudo seco ou de EDTA K3. A amostra populacional deste estudo ficou, assim, reduzida a 45 crianças, o que nos leva a crer que o verdadeiro número de crianças infetadas poderá ser superior ao detetado. De referir também que as amostras de segunda colheita foram apenas em 16 destas crianças, dado que as restantes crianças não compareceram à segunda colheita após o episódio de urgência.

A maioria da população em estudo tinha idade igual ou inferior a 2 anos. Não se verificou qualquer relação entre a infecção pelo HHV-6 com a idade ou sexo da criança. Da população em estudo, 17 apresentavam antecedentes familiares de convulsão febril, 37 tiveram a primeira convulsão e 27 tiveram a convulsão no primeiro dia de febre (Gráfico 3). No que respeita à causa da febre, apenas em 2% dos casos a febre foi inicialmente atribuída à infecção por HHV-6 e em 4% à infecção por HCMV.

Ao longo do estudo foram detetados 22 casos de carga viral positiva para o HHV-6, representando 48% do total das 46 crianças com amostra de sangue total (Gráfico 6).

Em relação ao diagnóstico laboratorial do HHV-6 é de realçar que neste estudo foi possível observar uma elevada percentagem de crianças com IgG anti-HHV-6 positiva (40%) e apenas um caso de IgM anti-HHV-6 positivo (2%), tanto na colheita de fase aguda, como na colheita realizada posteriormente. Numa primeira leitura dos resultados da ELISA, houve suspeita de um caso de seroconversão. Todas as amostras foram repetidas pela técnica de ELISA, tendo-se obtido o mesmo resultado. Os resultados positivos e indeterminados foram confirmados por IFA. A necessidade de recorrer à imunofluorescência prende-se no facto da ELISA não ser um método tão sensível e específico como a técnica de IFA para este vírus. Com esta técnica, verificou-se que não existia nenhum caso de seroconversão, pois tanto as IgG da primeira colheita como as da segunda colheita apresentavam fluorescência idêntica. Nas amostras fornecidas pelo INSA registaram-se dois casos de IgG positiva com IgM negativa e um caso de serologia negativa.

De modo a determinar se as IgG detetadas correspondiam a uma infeção recente ou antiga, realizou-se o estudo da avidéz das IgG. Neste estudo utilizou-se a diluição da amostra mencionada no *kit* da técnica de ELISA (1:101) e optou-se por uma solução de ureia com concentração de 8 M.

Considerando que previamente não foi possível determinar a concentração de ureia e a diluição de amostra ótimas, para o estudo da avidéz das IgG anti-HHV-6 (Tabela 4), a concentração da solução de ureia foi selecionada de acordo com o descrito na literatura. O estudo da avidéz das IgG para o HHV-6 revelou que todas as crianças apresentavam IgG de alta afinidade, isto é, avidéz superior a 70%, o que indica que a infeção por HHV-6 não era recente (Tabela 5).

Em relação à carga viral do HHV-6, foram detetadas 22 crianças com DNA do HHV-6 no sangue total, das quais 6 apresentaram DNA do vírus tanto no sangue total como no plasma. O valor máximo de carga viral obtido neste estudo foi de 73 996 cópias de HHV-6/ml no sangue total e 20 904 cópias de HHV-6/ml no plasma, da mesma criança. A criança que recorreu ao serviço de urgência, cuja causa de febre foi o Exantema súbito, tinha carga viral de 21 291 cópias de HHV-6/ml no sangue total e 13 838 cópias de HHV-6/ml no plasma.

Estes dados mostram que a carga viral detetada no sangue total é superior à detetada no plasma. Com base na análise estatística verificou-se que existe uma diferença estatisticamente significativa entre ambas as deteções ($p = 0,005$). Demonstra-se assim, que se estabelece uma relação entre a deteção no sangue total e no plasma, o que vem ao encontro do descrito na literatura. *Gautheret-Dejean, A. et al.*.

Apesar do maior número de casos de carga viral positiva no sangue total do que no plasma, ou seja da maior sensibilidade do sangue total em relação ao plasma, sugere-se que este último possa ser mais específico, pois não deteta tantas infeções latentes.

Assim, a deteção de HHV-6 no sangue total pode corresponder a maior número de casos de latência, indicando, deste modo que o plasma apresenta maior especificidade para a primoinfeção por HHV-6.

Devido à elevada prevalência de casos com DNA do HHV-6, foi colocada a hipótese de estarmos perante resultados falsamente positivos ou reação cruzada, pelo que se repetiu a técnica de PCR em tempo real, após novas extrações. Os resultados obtidos com os novos extratos foram semelhantes aos anteriores. Para excluir a presença de substâncias inibitórias, realizou-se a PCR em tempo real para o sangue total, com amostras diluídas (fator de diluição de 1:10), tendo-se confirmado o mesmo resultado.

Com o intuito de confirmar se os resultados negativos da técnica de PCR em tempo real para a pesquisa e quantificação de DNA de HHV-6 são verdadeiros negativos, isto é, que não houve inibição da reação de PCR, recorreu-se ao controlo interno sugerido pela casa comercial (*DICO Ampli*). Tendo em consideração o número limitado de testes, não foi possível realizar este controlo para todas as amostras. Como alternativa utilizou-se, para todas as amostras do estudo, o controlo interno da técnica de PCR em tempo real *in house* para a pesquisa e quantificação de HCMV. No decorrer deste procedimento, testou-se uma amostra, escolhida ao acaso, para verificar se o facto de ser uma amostra de plasma ou de sangue total poderia interferir nos resultados da técnica de PCR. Não se verificou qualquer interferência em nenhum dos casos, embora no resultado obtido tenha surgido a presença de HCMV. Este resultado não era esperado, uma vez que na ausência do controlo interno não deveria ocorrer amplificação da amostra. Com estes

dados surgiu a hipótese das amostras em estudo conterem DNA de HCMV e consequentemente a possibilidade de existir uma associação entre o HCMV e o HHV-6 no âmbito da convulsão febril em idade pediátrica.

Com base nos resultados obtidos tanto na serologia, como na detecção da carga viral do HHV-6, verificou-se que das 49 crianças que participaram no estudo, 5 apresentaram serologia compatível com infecção antiga (apenas IgG positiva), 18 tiveram resultados negativos tanto na serologia como na carga viral, o que indicia que ainda não estiveram em contacto com o HHV-6. Das 22 crianças que apresentaram PCR positiva, 4 deverão corresponder a infecções primárias, visto a serologia das mesmas ser negativa, enquanto as restantes 18 tiveram resultados positivos para ambas as técnicas. Neste último grupo de 18 crianças, suspeitava-se de provável infecção secundária por HHV-6 (reinfeção ou reativação), embora a possibilidade de detecção de vírus latentes não pudesse ser excluída. Foram ainda estudadas 4 crianças, cujo perfil de amostras não estava completo, e que por este motivo não foi possível retirar qualquer conclusão: 3 crianças apresentaram IgG positiva, mas não foi realizada a PCR e a uma criança não foi feita a serologia, apenas a PCR, que apresentou resultado negativo.

Considerando os dados discutidos até ao momento, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HHV-6 não se encontrava ainda devidamente esclarecido. Como referido anteriormente, embora tivesse sido detetado DNA do HHV-6, isto não significava que o vírus estivesse a provocar infecção, uma vez que é conhecida a capacidade de latência deste vírus e correspondente detecção. Por este motivo, foi realizada a pesquisa de mRNA, que permite discernir se a carga viral detetada está associada à replicação ativa do vírus ou, apenas, relacionada com o nível basal de expressão do vírus, aquando da fase de latência ou integração no cromossoma. Desta forma, foi necessário converter o mRNA em cDNA. No entanto, a sua detecção não foi de todo conclusiva, pois o resultado da primeira quantificação foi negativo para todas as amostras. Numa segunda tentativa utilizou-se menor quantidade de amostra, de modo a evitar uma eventual inibição da reação de PCR. Ainda assim, o resultado foi semelhante ao anterior. A análise do RNA não permitiu fazer a distinção entre latência, reativação ou reinfeção.

Posteriormente, testou-se o mesmo procedimento, em duplicado, para uma amostra de sangue total com elevada carga viral de HCMV (caso de primoinfeção). Um dos extraídos foi detetado e quantificado pela técnica de PCR em tempo real comercial, enquanto no outro substituiu-se a técnica comercial pela PCR *in house*. No primeiro caso, o resultado foi negativo, enquanto no segundo o resultado foi positivo. Este resultado sugere que poderá haver interferência/inibição entre algum reagente dos *kit* de extração ou síntese de cDNA e os reagentes do *kit* da PCR comercial. Desta forma, as determinações do mRNA para o HHV-6 não poderão ser consideradas válidas, ficando por determinar quais das amostras com serologia e PCR positivas correspondem a infecção secundária (reativação ou reinfeção) e quais correspondem a latência do vírus.

Em relação ao diagnóstico laboratorial do HCMV, foi possível detetar 7 casos de infecção por este vírus. O valor máximo de carga viral obtido no estudo do HCMV foi de 115 219 cópias/ml no sangue total. As crianças que recorreram ao serviço de urgência, cujas causas de febre foram a encefalite por HCMV e infecção respiratória num caso de HCMV congénito, tinham carga viral de 5 464 cópias/ml de sangue total e 2 510 cópias/ml de sangue total, respetivamente.

Dos 7 casos detetados, 4 crianças tinham também DNA do HHV-6, porém as restantes apenas apresentaram carga viral para o HCMV (Tabela 10). Foi detetado um dado raro de encontrar na literatura, a presença de virémia, fora do contexto de infecção primária recente por HCMV.

Na deteção e quantificação do HCMV compararam-se duas técnicas de PCR em tempo real, *in house* e comercial, tendo sido obtido resultados aproximadamente semelhantes.

Quanto à serologia para o HCMV, foi realizado o estudo das IgG e respetiva avidéz em todas as amostras cuja carga viral foi positiva. Verificou-se nestas amostras que a maioria apresentou IgG com elevada avidéz, salvo uma exceção cujo valor de avidéz é de 18%. Este último corresponde a uma infecção recente por HCMV, pois valores de avidéz inferiores a 40% indiciam a presença de uma infecção primária por HCMV.

Ao fazermos a comparação dos dados obtidos no estudo do HHV-6 e do HCMV, verificou-se que a criança que apresentava baixa avidéz para as IgG do HCMV (18%), tinha sido também, o único caso de IgM positiva para o HHV-6, com IgG anti-HHV-6 de elevada afinidade (85%). Com estes dados e tendo em conta a baixa especificidade da técnica de ELISA para as IgM anti-HHV-6, suspeita-se de reação cruzada, ou seja, a IgM anti-HHV-6 detetada pelo *kit* de ELISA deverá corresponder a um resultado falsamente positivo.

Através da análise estatística pretendeu-se averiguar se as infeções por HHV-6 e HCMV estavam associadas. Não foi, no entanto, detetada nenhuma relação entre o HCMV e o HHV-6 ($p>0,05$), pois não apresentam uma diferença estatisticamente significativa, ou seja, são variáveis independentes.

Em suma, cabe evidenciar que este estudo foi pioneiro em Portugal, no que respeita à determinação da taxa de infeção por HHV-6 em crianças com quadro clínico de convulsão febril. Igualmente, e que seja do nosso conhecimento, até à data nunca foi realizada uma investigação em Portugal que associasse a infeção do HCMV à convulsão febril. A inclusão no estudo da infeção por HCMV permitiu a comparação entre os dois vírus, no âmbito da convulsão febril em idade pediátrica, enriquecendo os resultados deste trabalho.

O baixo número de amostras obtidas dificultou a interpretação dos resultados e as referidas conclusões. Ainda assim, tendo como referência a amostra analisada, é possível retirar algumas conclusões significativas deste trabalho, que se poderão resumir da seguinte forma:

- Na população em estudo apenas 4/45 crianças tiveram infeção primária por HHV-6 e 7/45 tiveram infeção por HCMV, o que não permite provar que existe uma relação entre estas infeções e a convulsão febril.
- A carga viral do HHV-6 no plasma é um marcador virológico importante.

- Salienta-se a elevada percentagem de casos de virémia por HHV-6 associada a serologia positiva (18/45), suspeitando-se de provável infeção secundária. No entanto, a falha na deteção do mRNA não permitiu fazer a distinção entre latência e reativação ou reinfeção.
- Durante este estudo não foi detetada qualquer associação entre as infeções por HHV-6 e HCMV.

Sublinha-se, assim, que o estudo que agora termina, permitiu descortinar novas problemáticas e perscrutar novos caminhos que ficarão em aberto para futuras investigações. Sugere-se o aprofundamento da pesquisa de RNA de modo a investigar a percentagem elevada de casos de virémia associada a serologia positiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ablashi, D. V., C. L. Devin, T. Yoshikawa, I. Lautenschlager, and M. Luppi.** 2010. Review Part 3: Human Herpesvirus-6 in Multiple Non-Neurological Diseases. *J Med Virol.* **82(11)**:1903-10. doi:10.1002/jmv.
2. **Achour, A., D. Boutolleau, A. Slim, H. Agut, and A. Gautheret-Dejean.** 2007. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in plasma reflects the presence of infected blood cells rather than circulating viral particles. *J Clin Virol.* **38(4)**:280-5. doi:10.1016/j.jcv.2006.12.019.
3. **Adams, O., C. Krempe, G. Kögler, P. Wernet, and A. Scheid.** 1998. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis.* **178(2)**:544–6.
4. **Agut, H.** 2011. [Acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections: when and how to treat?]. *Path Biol.* **59(2)**:108–12. doi:10.1016/j.patbio.2010.07.015.
5. **Agut, H.** 2011. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J Clin Virol.* **52(3)**:164-71. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.008.
6. **Akkapaiboon, P., Y. Mori, T. Sadaoka, S. Yonemoto, and K. Yamanishi.** 2004. Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope. *J Virol.* **78(15)**:7969–7983. doi:10.1128/JVI.78.15.7969.
7. **Anderson, R. A., D. X. Liu, and U. A. Gompels.** 1996. Definition of a human herpesvirus-6 betaherpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *J Virol.* **217(2)**:517–526.
8. **Ansari, A., S. Li, M. J. Abzug, and A. Weinberg.** 2004. Human herpesviruses 6 and 7 and central nervous system infection in children. *Emerg Infect Dis.* **10(8)**:1450–4. doi:10.3201/eid1008.030788.
9. **Arbuckle, J. H., M. M. Medveczky, J. Luka, S. H. Hadley, A. Luegmayer, D. Ablashi, T. C. Lund, J. Tolar, K. De Meirleir, J. G. Montoya, A. L. Komaroff, P. F. Ambros, and P. G. Medveczky.** 2010. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:5563–5568.

10. **Arbuckle, J. H., and P. G. Medveczky.** 2011. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* **13(8-9)**: 731–41. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.006.
11. **Balachandran, N., R. E. Amelse, W. W. Zhou, and C. K. Chang.** 1989. Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J. Virol.* **63(6)**:2835.
12. **Barone, S. R., M. H. Kaplan, and L. R. Krilov.** 1995. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr.* 127(1):95-7.
13. **Bodéus M., S. Feyder, and P. Goubau.** 1998. Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Clin Diagn Virol.* **9(1)**:9-16.
14. **Boutolleau, D., C. Duros, P. Bonnafous, D. Caiola, A. Karras, N. D. Castro, M. Ouachée, P. Narcy, M. Gueudin, H. Agut, and A. Gautheret-Djean.** 2006. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol.* **35(3)**:257-63.
15. **Braun, D. K., G. Dominguez, and P. E. Pellett.** 1997. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev.* **10(3)**:521–67.
16. **Broccolo, F., F. Drago, A. M. Careddu, C. Foglieni, L. Turbino, C. E. Cocuzza, C. Gelmetti, P. Lusso, A. E. Rebora, and M. S. Malnati.** 2005. Additional evidence that pityriasis rosea is associated with reactivation of human herpesvirus-6 and -7. *J Invest Dermatol.* **124(6)**:1234–40. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23719.x.
17. **Buchwald, D., P. R. Cheney, D. L. Peterson, B. Henry, S. B. Wormsley, A. Geiger, D. V. Ablashi, S. Z. Salahuddin, C. Saxinger, R. Biddle, R. Kikinis, F. A. Jolesz, T. Folks, N. Balachandran, J. B. Peter, R. C. Gallo, and A. L. Komaroff.** 1992. A Chronic Illness Characterized by Fatigue, Neurologic and Immunologic Disorders, and Active Human Herpesvirus Type 6 Infection. *Ann Intern Med.* **116(2)**:103-13. doi:10.7326/0003-4819-116-2-103.
18. **Campadelli-Fiume, G., P. Mirandola, and L. Menotti.** 1999. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis.* **5(3)**:353–66. doi:10.3201/eid0503.990306.

19. **Caruso, A., E. Caselli, S. Fiorentini, A. Rotola, A. Prandini, E. Garrafa, E. Saba, G. Alessandri, E. Cassai, and D. Di Luca.** 2009. U94 of human herpesvirus 6 inhibits in vitro angiogenesis and lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106(48)**:20446-51. doi: 10.1073/pnas.0905535106.
20. **Caselli, E., and D. Di Luca.** 2007. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol.* **30(3)**:173–87.
21. **Caserta, M. T., D. J. Mock, and S. Dewhurst.** 2001. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis.* **33(6)**:829–33. doi:10.1086/322691
22. **Caserta, M. T., M. P. McDermott, S. Dewhurst, K. Schnabel, J. A. CRNAahan, L. Gilbert, G. Lathan, G. K. Lofthus, and C. B. Hall,** 2004. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr.* **145(4)**:478–84. doi:10.1016/j.jpeds.2004.06.016.
23. **Caserta, M. T., C. B. Hall, K. Schnabel, G. Lofthus, and M. P. McDermott.** 2007. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 infections in pregnant women. *J Infect Dis.* **196(9)**:1296–303. doi:10.1086/522430.
24. **Caserta, M. T., C. B. Hall, K. Schnabel, G. Lofthus, A. Marino, L. Shelley, C. Yoo, J. CRNAahan, L. Anderson, and H. Wang.** 2010. Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6). *J Clin Virol.* **48(1)**:55-7. doi:10.1016/j.jcv.2010.02.007.
25. **Cassina, G., D. Russo, D. De Battista, F. Broccolo, P. Lusso, and M. S. Malnati.** 2013. Calibrated real-time polymerase chain reaction for specific quantitation of HHV-6A and HHV-6B in clinical samples. *J Virol Methods.* **189(1)**:172–9. doi:10.1016/j.jviromet.2013.01.018.
26. **Cattaneo, R.** 2004. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J virol.* **78(9)**:4385–4388. doi:10.1128/JVI.78.9.4385.
27. **Chapenko, S., A. Krumina, I. Logina, S. Rasa, M. Chistjakovs, A. Sultanova, L. Viksna, and M. Murovska.** 2012. Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus b19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Adv Virol.* **2012**:205085. doi:10.1155/2012/205085.

28. **Chee, M., S. A. Rudolph, B. Plachter, B. Barrell, and G. Jahn.** 1989. Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol.* **63(3)**:1345–53.
29. **Chen, T., and S. D. Hudnall.** 2006. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol.* **19(5)**:726–37. doi:10.1038/modpathol.3800584.
30. **Chisholm, C., and L. Lopez.** 2011. Cutaneous infections caused by Herpesviridae: a review. *Arch Pathol Lab Med.* **135(10)**:1357–62. doi:10.5858/arpa.2010-0156-RS.
31. **Chiu, S. S., C. Y. Cheung, C. Y. Tse, and M. Peiris.** 1998. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis.* **178(5)**:1250–6.
32. **Clark D. A., E. P. Nacheva, H. N. Leong, D. Brazma, Y. T. Li, E. H. Tsao, H. C. Buyck, C. E. Atkinson, H. M. Lawson, M. N. Potter, and P. D. Griffiths.** 2006. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* **193(7)**:912-6.
33. **Collot S., B. Petit, D. Bordessoule, S. Alain, M. Touati, F. Denis, and S. Ranger-Rogez.** 2002. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol.* **40(7)**:2445-51. doi: 10.1128/JCM.40.7.2445-2451.2002.
34. **Crawford J. R., M. R. Santi, H. K. Thorarinsdottir, R. Cornelison, E. J. Rushing, H. Zhang, K. Yao, S. Jacobson, and T. J. Macdonald.** 2009. Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric brain tumors: association of viral antigen in low grade gliomas. *J Clin Virol.* **46(1)**:37-42. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.011.
35. **Daibata, M., T. Taguchi, Y. Nemoto, H. Taguchi, and I. Miyoshi.** 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* **94(5)**:1545-1549.
36. **Dahl, H., G. Fjaertoft, T. Norsted, F. Z. Wang, M. Mousavi-Jazi, and A. Linde.** 1999. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J Infect Dis.* **180(6)**:2035–8. doi:10.1086/315115.

37. **Davison A., and D. Bhella.** Comparative betaherpes viral genome and virion structure. 2007. c. 14, p.187. In Arvin, A., G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi (ed), Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press, New York, USA.
38. **De Bolle, L., L. Naesens, and E. De Clercq.** 2005. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* **18(1)**:217–245. doi:10.1128/CMR.18.1.217.
39. **Deback, C., F. Agbalika, C. Scieux, A. G. Marcelin, A. Gautheret-Dejean, J. Cherot, L. Hermet, O. Roger, and H. Agut.** 2008. Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J Virol Methods.* **149(2)**:285–91. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.026.
40. **DesJardin, J. A., E. Cho, S. Supran, L. Gibbons, B. G. Werner, and D. R. Snydman.** 2001. Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* **33(8)**:1358–62. doi:10.1086/323336.
41. **Dockrell, D. H.** 2003. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J. Med. Microbiol.* **52**:5–18. doi: 10.1099/jmm.0.05074-0.
42. **Dollard, S. C., S. A. S. Staras, M. M. Amin, D. S. Schmid, and M. J. Cannon.** 2011. National Prevalence Estimates for Cytomegalovirus IgM and IgG Avidity and Association between High IgM Antibody Titer and Low IgG Avidity. *Clin Vaccine Immunol.* **18(11)**:1895–1899. doi: 10.1128/CVI.05228-11.
43. **Dominguez, G., T. R. Dambaugh, F. R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, and P. E. Pellett.** 1999. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol.* **73(10)**:8040–52.
44. **Efstathiou, S., G. L. Lawrence, C. M. Brown, and B. G. Barrell.** 1992. Identification of homologues to the human cytomegalovirus US22 gene family in human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* **73(Pt 7)**:1661–71.

45. **Ellinger, K., F. Neipel, L. Foà-Tomasi, G. Campadelli-Fiume, and B. Fleckenstein.** 1993. The glycoprotein B homologue of human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* **74(Pt 3)**:495-500.
46. **Flamand L., A. Gravel, D. Boutolleau, R. Alvarez-Lafuente, S. Jacobson, M. S. Malnati, D. Kohn, Y. W. Tang, T. Yoshikawa, and D. Ablashi.** 2008. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 6 DNA in serum. *J Clin Microbiol.* **46(8)**:2700-6. doi: 10.1128/JCM.00370-08.
47. **Flamand, L., A. L. Komaroff, J. H. Arbuckle, P. G. Medveczky, and D. V. Ablashi.** 2010. Review, Part 1: Human Herpesvirus-6 – Basic Biology, Diagnostic Testing, and Antiviral Efficacy. *J Med Virol.* **82(9)**:1560-8. doi:10.1002/jmv.
48. **Freitas, R. B., M. R. Freitas, and A. C. Linhares.** 2000. Outbreaks of human-herpes vírus 6 (HHV-6) infection in day-care centers in Belém, Pará, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* **42(6)**:305-311. doi: 10.1590/S0036-46652000000600002.
49. **Freitas, R. B., M. R. Freitas, and A. C. Linhares.** 2003. Evidence of active herpesvirus 6 (variant-A) infection in patients with lymphadenopathy in Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **45(5)**:283–288.
50. **Fotheringham, J., D. Donati, N. Akhyani, A. Fogdell-Hahn, A. Vortmeyer, J. D. Heiss, E. Williams, S. Weinstein, D. A. Bruce, W. D. Gaillard, S. Sato, W. H. Theodore, and S. Jacobson.** 2007. Association of Human Herpesvirus-6B with Mesial Temporal Lobe Epilepsy". *PLoS Medicine.* **4(5)**:e180. doi:10.1371/journal.pmed.0040180.
51. **Gallo, R.C.** 2006. A perspective on human herpes virus 6 (HHV-6). *J Clin Virol* **1**:S2.
52. **Gautheret-Dejean, A., C. Manichanh, F. Thien-Ah-Koon, A. M. Fillet, N. Mangeney, M. Vidaud, N. Dhedin, J. P. Vernant, and H. Agut.** 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods.* **100(1-2)**:27-35.
53. **Gautheret-Dejean, A., C. Henquell, F. Mousnier, D. Boutolleau, P. Bonnafous, N. Dhédin, C. Settegrana, and H. Agut.** 2009. Different

- expression of human herpesvirus-6 (HHV-6) load in whole blood may have a significant impact on the diagnosis of active infection. *J Clin Virol.* **46(1)**:33-6. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.020.
54. **Gibson, U. E., C. A. Heid, and P. M. Williams.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6(10)**:995-1001.
 55. **Gompels, U. A., and H. A. Macaulay.** 1995. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J. Gen. Virol.* **76**:451-458.
 56. **Gompels, U. A., J. Nicholas, G. Lawrence, M. Jones, B. J. Thomson, M. E. Martin, S. Efstathiou, M. Craxton, and H. A. Macaulay.** 1995. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology.* **209(1)**:29-51. doi: 10.1006/viro.1995.1228.
 57. **Grangeot-Keros L., M. J. Mayaux, P. Lebon, F. Freymuth, G. Eugene, R. Stricker, and E. Dussaix.** 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis.* **175(4)**:944-6.
 58. **Gravel, A., A. Tomoiu, and L. Flamand.** 2007. La phase très précoce de l' infection par le sixième herpèsvirus humain: rôle des protéines IE1 et IE2. *Virology.* **11**:181-93.
 59. **Grinde, B.** 2013. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* **5(5)**:1–9. doi:10.3402/jom.v5i0.22766.
 60. **Grivel, J., F. Santoro, S. Chen, G. Faga, M. S. Malnati, Y. Ito, L. Margolis, and P. Lusso.** 2003. Pathogenic Effects of Human Herpesvirus 6 in Human Lymphoid Tissue Ex Vivo. *J Virol.* **77(15)**:8280–8289. doi:10.1128/JVI.77.15.8280.
 61. **Gutiérrez, J., M. Rodríguez, M. C. Maroto, G. Piédrola, and J. Peirón.** 1997. Behaviour of IgG antibody avidity for the antigen and of IgA antibody in active cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus and human herpes virus 6 infections. Adaptation of a commercial test. *J Infect.* **35(1)**:25-30.
 62. **Hall, C. B., C. E. Long, K. C. Schnabel, M. T. Caserta, K. M. McIntyre, M. A. Constanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R. A. Insel, and L. G. Epstein.** 1994. Human Herpesvirus-6 infection in children - A Prospective Study of

- Complications and Reactivation. *N Engl J Med* **331**:432-438. doi:10.1056/NEJM199408183310703.
63. **Hall, C. B., M. T. Caserta, K. C. Schnabel, C. Long, L. G. Epstein, R. A. Insel, and S. Dewhurst.** 1998. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis.* **26**(1):132–7.
 64. **Hall, C. B., M. T. Caserta, K. C. Schnabel, L. M. Shelley, J. A. CRNAahan, A. S. Marino, C. Yoo, and G. K. Lofthus.** 2011. Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus. *J Infect Dis.* **201**(4):505–507. doi:10.1086/650495.
 65. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**(10):986-94.
 66. **Hermouet, S., C. A. Sutton, T. M. Rose, R. J. Greenblatt, I. Corre, R. Garand, A. M. Neves, R. Bataille, and J. W. Casey.** 2003. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviuses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* **17**:185-95. doi:10.1038/sj.leu.2402748.
 67. **Hidaka, Y., K. Kusuhara, A. Takabayashi, K. Okada, C. Miyazaki, T. Aoki, and K. Ueda.** 1997. Symptomatic primary infection with human herpesvirus 6 variant A. *Clin Infect Dis.* **24**(5):1022-3.
 68. **Huang, L. M., C. Y. Lee, M. H. Chang, J. D. Wang, and C. Y. Hsu.** 1993. Primary infections of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus-6. *Arch Dis Child.* **68**(3):408–11.
 69. **Hukin, J., K. Farrell, L. M. MacWilliam, M. Colbourne, E. Waida, R. Tan, L. Mroz, and E. Thomas.** 1998. Case-Control Study of Primary Human Herpesvirus 6 Infection in Children With Febrile Seizures. *Pediatrics.* **101**(2):E3. doi:10.1542/peds.101.2.e3
 70. **Isaacson, M. K., L. K. Juckem, and T. Compton.** 2008. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* **325**:85–100.
 71. **Isegawa, Y., T. Mukai, K. Nakano, M. Kagawa, J. Chen, Y. Mori, T. Sunagawa, K. Kawanishi, J. Sashihara, A. Hata, P. Zou, H. Kosuge, and K.**

- Yamanishi.** 1999. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol.* **73(10)**:8053–63.
72. **Jeulin, H., A. Salmon, A. Gautheret-Dejean, H. Agut, P. Bordigoni, B. Fortier, and V. Venard.** 2009. Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol.* **45(1)**:43-6. doi:10.1016/j.jcv.2009.02.006.
 73. **Karlsson, T., L. Mannonen, R. Loginov, M. Lappalainen, K. Höckerstedt, and I. Lautenschlager.** 2012. Developmant of a new quantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAemia after liver transplantation. *J Virol Methods* **181**:25-36. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.01.007.
 74. **Kawabata, A., C. Jasirwan, K. Yamanishi, and Y. Mori.** 2012. Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation. *Virology.* **429(1)**:21–28. doi:10.1016/j.virol.2012.03.027.
 75. **Koidl, C., M. Bozic, E. Marth, and H. H. Kessler.** 2008. Detection of CMV DNA: is EDTA whole blood superior to EDTA plasma? *J Virol Methods.* **154(1-2)**:210–2. doi:10.1016/j.jviromet.2008.08.012.
 76. **Kondo, K., T. Kondo, T. Okuno, M. Takahashi, and K. Yamanishi.** 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol.* **72(Pt 6)**:1401–8.
 77. **Kondo, K., K. Shimada, J. Sashihara, and K. Tanaka-Taya.** 2002. Identification of Human Herpesvirus 6 Latency-Associated Transcripts Identification of Human Herpesvirus 6 Latency-Associated Transcripts. *J Virol.* **76(8)**:4145-51. doi:10.1128/JVI.76.8.4145.
 78. **Kondo K., H. Nozaki, K. Shimada, and K. Yamanishi.** 2003. Detection of a gene cluster that is dispensable for human herpesvirus 6 replication and latency. *J Virol.* **77(19)**:10719-24.
 79. **Kondo, K., J. Sashihara, K. Shimada, K. Amo, H. Miyagawa, M. Takemoto, and K. Yamanishi.** 2003. Recognition of a Novel Stage of Betaherpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6. *J Virol.* **77(3)**:2258-64. doi:10.1128/JVI.77.3.2258.

80. **Krueger, G. R., and D. V. Ablashi.** 2003. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology*. **46(5)**:257-69. doi: 10.1159/000073205.
81. **Lacroix, A., S. Collot-Teixeira, L. Mardivirin, A. Jaccard, B. Petit, C. Piguet, F. Sturtz, P. M. Preux, D. Bordessoule, and S. Ranger-Rogez.** 2010. Involvement of human herpesvirus-6 variant B in classic Hodgkin's lymphoma via DR7 oncoprotein. *Clin Cancer Res*. **16(19)**:4711-21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0470.
82. **Laina, I., V. P. Syriopoulou, G. L. Daikos, E. S. Roma, F. Papageorgiou, T. Kakourou, and M. Theodoridou,** 2009. Febrile Seizures and Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *J Pediatr Neurol*. **42(1)**:28-31. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.07.016.
83. **Lautenschlager, I., and R. R. Razonable.** 2012. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. *Transpl Int*. **25(5)**:493–502. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01443.x.
84. **Lazzarotto, T., A. Ripalti, G. Bergamini, M. C. Battista, P. Spezzacatena, F. Campanini, P. Pradelli, S. Varani, L. Gabrielli, G. T. Maine, and M. P. Landini.** 1998 Development of a New Cytomegalovirus (CMV) Immunoglobulin M (IgM) Immunoblot for Detection of CMV-Specific IgM. *J Clin Microbiol*. **36(11)**:3337–3341.
85. **Lawrence, G. L., M. Chee, M. A. Craxton, U. A. Gompels, R. W. Honess, and B. G. Barrell.** 1990. Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol*. **64(1)**:287–99.
86. **Levy, J. A.** 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet*. **349(9051)**:558–63. doi:10.1016/S0140-6736(97)80119-5.
87. **Littler, E., G. Lawrence, M. Y. Liu, B. G. Barrell, and J. R. Arrand.** 1990. Identification, cloning, and expression of the major capsid protein gene of human herpesvirus 6. *J Virol*. **64(2)**:714–22.
88. **Lou, J., Y. Wu, M. Cai, X. Wu, and S. Shang.** 2011. Subtype-specific, probe-based, real-time PCR for detection and typing of human herpesvirus-6 encephalitis from pediatric patients under the age of 2 years. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **70(2)**:223–9. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.002.

89. **Luppi, M., P. Barozzi, C. M. Morris, E. Merelli, and G. Torelli.** 1998. Integration of human herpesvirus 6 genome in human chromosomes. *Lancet*. **352**:1707-8. doi:10.1016/S0140-6736(05)61483-3.
90. **Luppi, M., P. Barozzi, C. Morris, A. Maiorana, R. Garber, G. Bonacorsi, A. Donelli, R. Marasca, A. Tabilio, and G. Torelli.** 1999. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol*. **73**(1):754–9.
91. **Lusso, P., P. D. Markham, E. Tschachler, F. di Marzo Veronese, S. Z. Salahuddin, D. V. Ablashi, S. Pahwa, K. Krohn, and R. C. Gallo.** 1988. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med*. **167**(5):1659-70.
92. **Lusso, P., A. De Maria, M. Malnati, F. Lori, S. E. Derocco, M. Baseler, and R. C. Gallo.** 1991. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8⁺ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature*. **349**(6309):533–5. doi:10.1038/349533a0.
93. **Lusso P., R. W. Crowley, M. S. Malnati, C. Di Serio, M. Ponzoni, A. Biancotto, P. D. Markham, and R. C. Gallo.** 2007. Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(12):5067-72. doi: 10.1073/pnas.0700929104.
94. **Maeki T., and Y. Mori.** 2012. Features of Human Herpesvirus-6A and -6B Entry. *Adv Virol*. **2012**:384069. doi: 10.1155/2012/384069.
95. **Mannonen, L., E. Herrgård, P. Valmari, P. Rautiainen, K. Uotila, M. R. Aine, P. Karttunen-Lewandowski, J. Sankala, T. Wallden, and M. Koskiniemi.** 2007. Primary human herpesvirus-6 infection in the central nervous system can cause severe disease. *Pediatr Neurol*. **37**:186-191.
96. **Martin, L. K., A. Schub, S. Dillinger, and A. Moosmann.** 2012. Specific CD8⁺ T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol*. **42**(11):2901–12. doi:10.1002/eji.201242439.
97. **Martin, M. E., B. J. Thomson, R. W. Honess, M. A. Craxton, U. A. Gompels, M. Y. Liu, E. Littler, J. R. Arrand, I. Teo, and M. D. Jones.** 1991. The genome of human herpesvirus 6: maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol*. **72**(Pt 1):157–68.

98. **Massih, R. C. A., and R. R. Razonable.** 2009. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* **15(21)**:2561–2569. doi: 10.3748/wjg.15.2561.
99. **Matsuura, M., M. Takemoto, K. Yamanishi, and Y. Mori.** 2011. Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression. *Virology.* **8(1)**:9. doi:10.1186/1743-422X-8-9.
100. **McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* **117(1)**:90–104. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.002.
101. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* **9(4)**:423–9. doi:10.1016/j.mib.2006.06.013.
102. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* **143(2)**:222–34. doi:10.1016/j.virusres.2009.03.018.
103. **Miendje Deyi Y., P. Goubau, and M. Bodéus.** 2000. False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19(7)**: 557–60.
104. **Mirandola, P., P. Menegazzi, S. Merighi, T. Ravaioli, E. Cassai, and D. Di Luca.** 1998. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol.* **72(5)**:3837–44.
105. **Mlechkovich, G., and N. Frenkel.** 2007. Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B Alter E2F1/Rb Pathways and E2F1 Localization and Cause Cell Cycle Arrest in Infected T Cells. *J virol.* **81(24)**:13449. doi: 10.1128/JVI.01496-07.
106. **Mori, Y., H. Yagi, T. Shimamoto, Y. Isegawa, T. Sunagawa, R. Inagi, K. Kondo, Y. Tano, and K. Yamanishi.** 1998. Analysis of human herpesvirus 6 U3 gene, which is a positional homolog of human cytomegalovirus UL 24 gene. *Virology.* **249(1)**:129–39. doi:10.1006/viro.1998.9305.
107. **Mori, Y., P. Akkapaiboon, X. Yang, and K. Yamanishi.** 2003. The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL

- glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol.* **77(4)**:2452–2458. doi:10.1128/JVI.77.4.2452.
108. **Mori, Y., X. Yang, P. Akkapaiboon, T. Okuno, and K. Yamanishi.** 2003. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol.* **77(8)**:4992–4999. doi:10.1128/JVI.77.8.4992.
 109. **Mori, Y., P. Akkapaiboon, S. Yonemoto, M. Koike, M. Takemoto, T. Sadaoka, Y. Sasamoto, S. Konishi, Y. Uchiyama, and K. Yamanishi.** 2004. Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol.* **78(9)**:4609–4616. doi:10.1128/JVI.78.9.4609.
 110. **Morissette, G., and L. Flamand.** 2010. Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol.* **84(23)**:12100–9. doi:10.1128/JVI.01169-10.
 111. **Nastke, M. D., A. Becerra, L. Yin, O. Dominguez-Amorocho, L. Gibson, L. J. Stern, and J. M. Calvo-Calle.** 2012. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol.* **86(9)**:4776–92. doi:10.1128/JVI.06573-11.
 112. **Neipel, F., K. Ellinger, and B. Fleckenstein.** 1992. Gene for the major antigenic structural protein (p100) of human herpesvirus 6. *J Virol.* **66(6)**:3918–3924.
 113. **Niehusmann, P., T. Mittelstaedt, C. G. Bien, J. F. Drexler, A. Grote, S. Schoch, and A. J. Becker.** 2010. Presence of human herpes virus 6 DNA exclusively in temporal lobe epilepsy brain tissue of patients with history of encephalitis. *Epilepsia.* **51(12)**:2478–83. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02741.x.
 114. **Ogata M.** 2009. Human herpesvirus 6 in hematological malignancies. *J Clin Exp Hematop.* **49(2)**:57-67. doi: 10.3960/jslrt.49.57
 115. **Okuno, T., K. Takahashi, K. Balachandra, K. Shiraki, K. Yamanishi, M. Takahashi, and K. Baba.** 1989. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol.* **27(4)**:651–653.
 116. **Øster, B., and P. Höllsberg.** 2002. Viral Gene Expression Patterns in Human Herpesvirus 6B-Infected T Cells. *J Virol.* **76(15)**:7578–7586. doi:10.1128/JVI.76.15.7578.

117. **Oyaizu, H., H. Tang, M. Ota, N. Takenaka, K. Ozono, K. Yamanishi, and Y. Mori.** 2012. Complementation of the function of glycoprotein H of human herpesvirus 6 variant A by glycoprotein H of variant B in the virus life cycle. *J Virol.* **86(16)**:8492–8. doi:10.1128/JVI.00504-12.
118. **Pellett, P. E., D. V. Ablashi, P. F. Ambros, H. Agut, M. T. Caserta, V. Descamps, L. Flamand, A. Gautheret-Dejean, C. B. Hall, R. T. Kamble, U. Kuehl, D. Lassner, I. Lautenschlager, K. S. Loomis, M. Luppi, P. Lusso, P. G. Medveczky, J. G. Montoya, Y. Mori, M. Ogata, J. C. Pritchett, S. Rogez, E. Seto, K. N. Ward, T. Yoshikawa, and R. R. Razonable.** 2012. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol.* **22(3)**:144–155. doi:10.1002/rmv.
119. **Pichereau, C., K. Desseaux, A. Janin, C. Scieux, R. Peffault de Latour, A. Xhaard, M. Robin, P. Ribaud, F. Agbalika, S. Chevret, and G. Socié.** 2012. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* **18(1)**:141–4. doi:10.1016/j.bbmt.2011.07.018.
120. **Pozo, F., and A. Tenorio.** 1999. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* **79(1)**:9–19.
121. **Prince, H. E., and A. L. Leber.** 2002. Validation of an In-House Assay for Cytomegalovirus Immunoglobulin G (CMV IgG) Avidity and Relationship of Avidity to CMV IgM Levels. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9(4)**:824–827. doi: 10.1128/CDLI.9.4.824-827.2002.
122. **Pritchett, J. C., R. M. Nanau, and M. G. Neuman.** 2012. The link between Hypersensitivity Syndrome Reaction Development and Human Herpes Virus-6 Reactivation. *Int J Hepatol.* **2012**:723062. doi:10.1155/2012/723062.
123. **Pruksananonda, P, C. B. Hall, R. A. Insel, K. McIntyre, P. E. Pellett, C. E. Long, K. C. Schnabel, P. H. Pincus, F. R. Stamey, T. R. Dambaugh, and J. A. Stewart.** 1992. Primary Human Herpesvirus 6 Infection in Young Children. *N Engl J Med.* **326**:1445-1450. doi: 10.1056/NEJM199205283262201.
124. **Ramroodi, N., N. Sanadgol, Z. Ganjali, A. A. Niazi, V. Sarabandi, and A. Moghtaderi.** 2013. Monitoring of active human herpes virus 6 infection in

- Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis. *J Pathog.* **2013**:194932. doi:10.1155/2013/194932.
125. **Ranger, S., S. Patillaud, F. Denis, A. Himmich, A. Sangare, S. M'Boup, A. Itoua-N'Gaporo, M. Prince-David, R. Chout, R. Cevallos, and H. Agut.** 1991. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol.* **34(3)**:194–8.
 126. **Razonable, R. R., C. Fanning, R. A. Brown, M. J. Espy, A. Rivero, J. Wilson, W. Kremers, T. F. Smith, and C. V. Paya.** 2002. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis.* **185(1)**:110–3. doi:10.1086/324772.
 127. **Rotola, A., T. Ravaioli, A. Gonelli, S. Dewhurst, E. Cassai, and D. DiLuca.** 1998. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(23)**:13911–6.
 128. **Rotola A., E. Cassai, M. R. Tola, E. Granieri, and D. Di Luca.** 1999. Human herpesvirus 6 is latent in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **67(4)**:529-31.
 129. **Rotola A., D. Di Luca, E. Cassai, D. Ricotta, A. Giulio, A. Turano, A. Caruso, and C. Muneretto.** 2000. Human herpesvirus 6 infects and replicates in aortic endothelium. *J Clin Microbiol.* **38(8)**:3135-6.
 130. **Salonen, M. J. H., M. A. Siimes, E. Salonen, A. Vaheri, and M. Koskiniemi.** 2002. Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia. *Leukaemia.* **16(4)**:716-9. doi:10.1038/sj/leu/2402437.
 131. **Santoro, F., P. E. Kennedy, G. Locatelli, M. S. Malnati, E. A. Berger, and P. Lusso.** 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.* **99(7)**:817–27.
 132. **Santoro, F., H. L. Greenstone, A. Insinga, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, P. Lusso, and E. A. Berger.** 2003. Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J Biol Chem.* **278(28)**:25964–25969. doi:10.1074/jbc.M302373200.

133. **Sassenscheidt, J., J. Rohayem, T. Illmer, and D. Bandt.** 2006. Detection of beta-herpesviruses in allogenic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*. **138(1-2)**:40-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.015.
134. **Schroeder, R. B., T. F. Michelon, G. Garbin, V. Garcia, J. G. Silveira, L. Santos, J. Neumann, and E. Keitel.** 2012. Early HHV-6 replication is associated with morbidity non-related to CMV infection after kidney transplantation. *Braz J Infect Dis*. **16(2)**:146–52.
135. **Secchiero, P., D. Zella, R. W. Crowley, R. C. Gallo, and P. Lusso.** 1995. Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Microbiol*. **33(8)**:2124–2130.
136. **Spear, P. G., and R. Longnecker.** 2003. Herpesvirus Entry: an Update. *J Virol*. **77(19)**:10179-85. doi:10.1128/JVI.77.19.10179.
137. **Suga, S., K. Suzuki, M. Ihira, T. Yoshikawa, Y. Kajita, T. Ozaki, K. Iida, Y. Saito, and Y. Asano.** 2000. Clinical characteristics of febrile convulsions during primary HHV-6 infection. *Arch Dis Child*. **82(1)**:62–6.
138. **Stackpole, C. W.** Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. 1969. *J Virol*. **4(1)**:75-93.
139. **Takahashi, K., S. Sonoda, K. Higashi, T. Kondo, H. Takahashi, M. Takahashi, and K. Yamanishi.** 1989. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol*. **63(7)**:3161–3.
140. **Takeda, K., N. Nakagawa, T. Yamamoto, R. Inagi, K. Kawanishi, Y. Isegawa, and K. Yamanishi.** 1996. Prokaryotic expression of an immediate-early gene of human herpesvirus 6 and analysis of its viral antigen expression in human cells. *Virus Res*. **41(2)**:193–200.
141. **Tang, H., A. Kawabata, M. Takemoto, K. Yamanishi, and Y. Mori.** 2008. Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology*. **378(2)**:265–271. doi:10.1016/j.virol.2008.05.028.
142. **Tavakoli, N. P., S. Nattanmai, R. Hull, H. Fusco, L. Dzigua, H. Wang, and M. Dupuis.** 2007. Detection and typing of human herpesvirus 6 by molecular methods in specimens from patients diagnosed with encephalitis or meningites. *J*

- Clin Microbiol. **45(12)**:3972-8. doi: 10.1128/JCM.01692-07.
143. **Theodore, W. H., S. Shinnar, W. D. Gaillard, M. S. Wainwright, and S. Jacobson.** 2008. Human Herpes Virus 6B: A possible Role in Epilepsy?. *Epilepsia*. **49(11)**:1828–1837. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01699.x.
144. **Tigue, N. J., P. J. Matharu, N. A. Roberts, J. S. Mills, J. Kay, and R. Jupp.** 1996. Cloning, expression and characterization of the proteinase from human herpesvirus 6. *J Virol*. **70(6)**:4136–41.
145. **Tohyama, M., and K. Hashimoto.** 2011. New aspects of drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Dermatol*. **38(3)**:222–8. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.01176.x.
146. **Torrìsi, M. R., M. Gentile, G. Cardinali, M. Cirone, C. Zompetta, L. V. Lotti, L. Frati, and A. Faggioni.** 1999. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology*. **257(2)**:460–71.
147. **Wang, F. Z., A. Linde, H. Dahl, and P. Ljungman.** 1999. Human herpesvirus 6 infection inhibits specific lymphocyte proliferation responses and is related to lymphocytopenia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. **24(11)**:1201–6. doi:10.1038/sj.bmt.1702058.
148. **Wang, L. R., L. J. Dong, M. J. Zhang, and D. P. Lu.** 2006. The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. **12(10)**:1031–7. doi:10.1016/j.bbmt.2006.06.001.
149. **Ward, K. N., D. J. Turner, X. Couto Parada, and A. D. Thiruchelvam.** 2001. Use of Immunoglobulin G Antibody Avidity for Differentiation of Primary Human Herpesvirus 6 and 7 Infections. *J Clin Microbiol*. **39(3)**:959–963. doi: 10.1128/JCM.39.3.959-963.2001.
150. **Ward, K. N., H. N. Leong, E. P. Nacheva, J. Howard, C. E. Atkinson, N. W. Davies, P. D. Griffiths, and D. A. Clark.** 2006. Human Herpesvirus 6 Chromosomal Integration in Immunocompetent Patients Results in High Levels of Viral DNA in Blood, Sera, and Hair Follicles. *J Clin Microbiol*. **44(4)**:1571–1574. doi:10.1128/JCM.44.4.1571.
151. **Ward, K. N., H. N. Leong, A. D. Thiruchelvam, C. E. Atkinson, and D. A. Clark.** 2007. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to

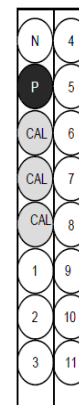
- primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol.* **45(4)**:1298–304. doi:10.1128/JCM.02115-06.
152. **Yamamoto, M., J. B. Black, J. A. Stewart, C. Lopez, and P. E. Pellett.** 1990. Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infection. *J Clin Microbiol.* **28(9)**:1957–62.
 153. **Yao K., S. Honarmand, A. Espinosa, N. Akhyani, C. Glaser, and S. Jacobson.** 2009. Detection of human herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. *Ann Neurol.* **65(3)**:257-67. doi: 10.1002/ana.21611.
 154. **Yao, K., J. R. Crawford, A. L. Komaroff, D. V. Ablashi, and S. Jacobson.** 2010. Review Part 2: Human Herpesvirus-6 in Central Nervous System Diseases. *J Med Virol.* **82(10)**:1669-78. doi:10.1002/jmv.
 155. **Yoshikawa, T., Y. Asano, M. Ihira, K. Suzuki, M. Ohashi, S. Suga, K. Kudo, K. Horibe, S. Kojima, K. Kato, T. Matsuyama, and Y. Nishiyama.** 2002. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis.* **185(7)**:847–53. doi:10.1086/339411.
 156. **Zerr, D. M., T. A. Gooley, L. Yeung, M. L. Huang, P. Carpenter, J. C. Wade, L. Corey, and C. Anasetti.** 2001. Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis.* **33(6)**:763–71. doi:10.1086/322642.
 157. **Zerr, D. M.** 2006. Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol.* **1**:S52-6. doi:10.1016/S1386-6532(06)70012-9.
 158. **Zhongliang, W., C. Rui, W. Xiangling, L. Ding, Z. Jinrong, G. Yanha,i and Z. Ju.** 2010. Detection of the four major human herpesviruses simultaneously in whole blood and cerebrospinal fluid samples by the fluorescence polarization assay. *Int J Infect Dis.* **14(10)**:e893–7. doi:10.1016/j.ijid.2010.03.023.
 159. **Zou, P., Y. Isegawa, K. Nakano, M. Haque, Y. Horiguchi, and K. Yamanishi.** 1999. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol.* **73**:5926–5933.

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo da técnica de ELISA utilizando o kit *Panbio® HHV6 IgM, Alere, Massachusetts, Estados Unidos da América.*

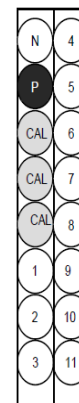
1. Deixar que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C) antes de serem usados.
2. Retirar o número necessário de tiras de micropoços e inserir no suporte de tiras, assegurando-se que as restantes tiras estão bem vedadas. Cinco micropoços são necessários para o controlo negativo, positivo e calibrados em triplicado.
3. Diluir o controlo positivo, o controlo negativo, o calibrador em triplicado e as amostras dos doentes, do seguinte modo:
 - A 10 µL de soro adicionar 90 µL de *Sample Diluent*, misturar bem.
 - A 20 µL de amostra diluída, do passo anterior, adicionar 180 µL de *Sample Absorbent*. Homogeneizar.
4. Pipetar 100 µL das amostras absorvidas, controlos e calibrador nos respetivos micropoços.
5. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37± 1°C.
6. Lavar 6 vezes com o *Wash Buffer* diluído (1 parte de *Wash Buffer* para 19 partes de água destilada).
7. Pipetar 100 µL de *HRP conjugated Anti-human IgG* para cada micropoço.
8. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37± 1°C.
9. Pipetar 100 µL de *TMB* para cada micropoço.
10. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), a contar do primeiro micropoço. Desenvolve-se a cor azul.
11. Pipetar 100 µL de *Stop Solution* para cada micropoço, na mesma sequência da adição do TMB. Homogeneizar. A cor azul muda para amarelo.
12. Dentro de 30 minutos ler a absorvância de cada poço com um comprimento de onda de 450 nm.



ANEXO II

Protocolo da técnica de ELISA utilizando o kit *Panbio*[®] *HHV6 IgG*, Alere, Massachusetts, Estados Unidos da América.

1. Deixar que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C) antes de serem usados.
2. Retirar o número necessário de tiras de micropoços e inserir no suporte de tiras, assegurando-se que as restantes tiras estão bem vedadas. Cinco micropoços são necessários para o controlo negativo, positivo e calibrados em triplicado.
3. Diluir o controlo positivo, o controlo negativo, o calibrador em triplicado e as amostras dos doentes, do seguinte modo: 10 µL de soro para 1000 µL de *Sample Diluent*.
4. Pipetar 100 µL das amostras diluídas, controlos e calibrador nos respetivos micropoços.
5. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37± 1°C.
6. Lavar 6 vezes com o *Wash Buffer* diluído (1 parte de *Wash Buffer* para 19 partes de água destilada).
7. Pipetar 100 µL de *HRP conjugated Anti-human IgG* para cada micropoço.
8. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37± 1°C.
9. Pipetar 100 µL de *TMB* para cada micropoço.
10. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), a contar do primeiro micropoço. Desenvolve-se a cor azul.
11. Pipetar 100 µL de *Stop Solution* para cada micropoço, na mesma sequência da adição do TMB. Homogeneizar. A cor azul muda para amarelo.
12. Dentro de 30 minutos ler a absorvância de cada poço com um comprimento de onda de 450 nm.



ANEXO III

Protocolo da técnica de IFA utilizando o kit *Biotrin Human Herpesvirus-6 IgG IFA*, Diasorin, Saluggia, Itália.

1. Permitir que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C) antes de serem utilizados.
2. Diluir as amostras de soro a 1:20 em PBS. Todas as diluições devem ter um volume mínimo de 0,1 ml.
3. Dispensar 1 gota (aproximadamente 20 µl) de cada amostra de teste diluído e 1 gota (aproximadamente 20 µl) dos Controlos Positivos e Negativos prontos a usar nos poços numerados.
4. Incubar as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 35-39°C.
5. Lavar as lâminas ao longo da borda numa corrente ligeira de tampão de Lavagem usando uma garrafa de lavagem. Evitar dirigir a corrente para os poços. Colocar as lâminas num tabuleiro de lavagem contendo tampão de Lavagem durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) com uma alteração da solução do tampão de lavagem, após 5 minutos. Secar a máscara de tinta à volta dos poços com os absorventes de marcadores dados.
6. Aplicar 1 gota (aproximadamente 40 µl) do conjugado em cada poço de teste. Incubar as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 35-39°C.
7. Aplicar 1 gota do meio de montagem no centro de cada poço e aplicar uma cobertura.
8. Examinar a lâmina num microscópio fluorescente usando uma magnificação de 200-500x, imediatamente após o término do teste.

Considera-se que uma amostra é negativa para anticorpos IgG de HHV-6, se não houver marcação fluorescente de células infetadas.

A reatividade positiva pode variar em intensidade de fluorescência de brilhante a fraco. Classificar a reação de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: +4 (brilhante), +3 (claro), +2 (moderado), +1 (fraco).

ANEXO IV

Protocolo de Extração do DNA utilizando o Kit de Purificação *JetQuick® Genomic DNA*, Genomed, Löhne, Alemanha.

A técnica deve ser executada segundo o protocolo de *MiniPrep*.

1. Antes de iniciar o protocolo prático, reconstituir os reagentes necessários:
 - a. Kx e K2 com etanol absoluto de acordo com as indicações nos rótulos dos reagentes, guardando os reagentes à temperatura ambiente;
 - b. *Genomed Protease* com água destilada até uma concentração final de 20 mg/ml, guardando a -20°C.
2. Preparar as amostras dos doentes a analisar, colocando 200 µl da amostra num tubo de 1,5 ml.
3. Ligar o termobloco a 58°C;
4. Adicionar os reagentes pela ordem indicada ao tudo de 1,5 ml que contém a amostra, agitando-o sempre no vortex sempre que se colocar um novo reagente:
 - a) 20 µl de *Genomed Protease*
 - b) 10 µl RNase A
 - c) 200 µl tampão Kx
5. Colocar o tubo no termobloco a 58°C e incubar durante 10 minutos;
6. Adicionar 200 µl de Etanol 96-100% e agitar no vortex, de modo a prevenir a precipitação dos ácidos nucleicos.
7. Colocar a coluna *JetQuick* sobre o tubo de coleta de 2 ml, ambos fornecidos pelo *kit*.
8. Colocar a mistura anterior na coluna;
9. Centrifugar durante um minuto a 10 000 rpm;
10. Descartar o filtrado que se encontra no tubo de coleta de 2 ml;
11. Adicionar 500 µl de tampão Kx;
12. Centrifugar durante um minuto a 10 000 rpm;
13. Descartar o filtrado que se encontra no tubo de coleta de 2 ml e colocar novamente a coluna no tubo de coleta;
14. Adicionar 500 µl de tampão K2;

15. Centrifugar durante um minuto a 10 000 rpm;
16. Descartar o líquido que se encontra no tubo de 2 ml e colocar novamente a coluna no tubo de coleta;
17. Centrifugar a coluna durante um minuto a 12 000 rpm, para secar a membrana de sílica;
18. Colocar a coluna sobre um novo tubo de coleta estéril de 1,5 ml;
19. Pré-aquecer a 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8,5 a 70°C;
20. Adicionar no centro da coluna e incubar durante 2 minutos à temperatura ambiente;
21. Centrifugar a coluna a 10 000 rpm durante 2 minutos;
22. Para obter um maior rendimento, efetuar uma segunda eluição para o tubo de 1,5 ml, repetindo os passos 20 e 21.
23. O tubo de 1,5 ml possui DNA purificado. Descartar a coluna;
24. Guardar o DNA a -20°C.

ANEXO V

Procedimento da técnica de PCR em Tempo Real para HHV-6 utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene™ ref.:69-100, Argene, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França.

1. Utilizar para cada amostra e padrão uma mistura de amplificação, que consiste em 15 µl da *premix* R6 com 10 µl da amostra, tendo em conta que a *premix* de amplificação para o HHV-6 (R6) está pronta a utilizar.
2. Realizar uma curva padrão utilizando quatro antigénios-padrão de quantificação – 1 1 250 (QS4), 12 500 (QS3), 125 000 (QS2) e 1 250 000 (QS1) cópias de HHV-6/ml.

Observação: Ter em conta que o valor atribuído a cada padrão dependerá do volume de extração da amostra inicial (sangue total ou plasma) e do volume da eluição final, neste caso 200 µl e 50 µl, respetivamente;

3. Utilizar um controlo negativo IC2W0, que resulta da extração da água (W0) com o controlo interno IC2, ambos fornecidos pelo *kit*.
4. Após a preparação da placa, programar o aparelho de RT-PCR ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystem*) com o seguinte programa de amplificação:
 - a. Ativação da Taq Polimerase durante 15 minutos a 95°C;
 - b. 45 Ciclos de desnaturação durante 10 segundos a 95°C e hibridação e extensão durante 40 segundos a 60°C.

Observação: O Controlo IC2W0 será o único poço onde a leitura será efetuada a 530 e a 560 nm. As restantes serão todas a 530 nm.

5. Para os resultados serem validados, devem existir as seguintes condições:
 - Nenhum sinal de amplificação no IC2W0 a 530 nm
 - Amplificação no IC2W0 a 560 nm com *Ct* igual ou inferior a 32 ciclos;
 - O Padrão QS3 deverá ter um valor de *Ct* entre 30 e 34 ciclos;
 - O *slope* da curva padrão deverá ser superior a -3,917 e inferior a -3,103.

ANEXO VI

Protocolo de Extração do RNA utilizando o Kit de *QIAamp*[®] *MinElute Virus Spin*, ref.:57704, Qiagen, Limburg, Holanda

1. Pipetar 25 µL de Protease num tubo de 1,5 ml.
2. Adicionar 200 µL de amostra.
3. Adicionar 200 µl de tampão AL (contendo 28 µg/ml de *carrier* DNA), fechar a tampa e misturar por vortex 15 segundos.
4. Incubar durante 15 minutos a 56°C, num bloco de aquecimento.
5. Centrifugar brevemente, de modo a remover as gotas existentes na tampa.
6. Adicionar 250 µl de Etanol (96-100%) à amostra, fechar a tampa e misturar por vortex 15 segundos. Incubar o lisado com Etanol durante 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar brevemente.
7. Aplicar cuidadosamente todo o lisado na coluna *QIAamp MinElute*, sem molhar o aro. Fechar a tampa e centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto.
8. Colocar a coluna num tubo de 2 ml limpo e descartar o tubo anterior com o filtrado.
9. Adicionar 500 µl de tampão AW1, sem molhar o aro. Fechar a tampa e centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto.
10. Colocar a coluna num tubo de 2 ml limpo e descartar o tubo de recolha anterior contendo o filtrado.
11. Adicionar 500 µl de tampão AW2, sem molhar o aro. Fechar a tampa e centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto.
12. Colocar a coluna num tubo de 2 ml limpo e descartar o tubo de recolha anterior contendo o filtrado.
13. Centrifugar à velocidade máxima durante 4 minutos, de modo a secar totalmente a membrana.
14. Colocar a coluna num novo tubo de coleta (1,5 ml) e rejeitar o tubo de recolha anterior contendo o filtrado.
15. Aplicar 60 µl de tampão AVE no centro da membrana. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar à velocidade máxima durante 2 minutos.

ANEXO VII

Protocolo da técnica de Tratamento com DNase utilizando o *Kit TURBO DNA-free™*, Ambion, Texas, Estados Unidos da América.

1. Pipetar para o microtubo de 200 µl os seguintes volumes:
 - 2 µl Tampão Turbo DNase 10x
 - 1,5 µl Turbo DNase
 - 16.5 µl de extrato de RNA
2. Colocar a 37°C durante 30 minutos (termociclador T-Gradient – Biometra).
3. Adicionar 2 µl de reagente de inativação e homogeneizar.
4. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente agitando ocasionalmente (tende a precipitar).
5. Centrifugar 2 minutos a 10 000 rpm.
6. Transferir 10 µl do extrato de RNA tratado para um tubo.
7. O restante volume deve ser transferido para outro tubo e armazenado a -80°C.

ANEXO VIII

Protocolo de síntese de cDNA utilizando a *SuperScript III*, Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América.

1. Pipetar para microtubo de 200 µl os seguintes volumes:
 - 10 µl RNA total tratado com DNase;
 - 1 µl Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's);
 - 1 µl *Hexaprimer [P(dN)6]* (Roche);
 - 1 µl Água livre de nucleases.
2. Aquecer a mistura a 65°C durante 5 minutos (termociclador T-Gradient – Biometra),
3. Colocar em gelo durante 1 minuto.
4. Fazer *spin* (MiniSpin – Eppendorf).
5. Colocar o microtubo em gelo e adicionar os seguintes volumes:
 - 4 µl 5x *First-Strand Buffer*;
 - 1 µl Ditioneitol (DTT) (0,1 M);
 - 1 µl *Recombinant RNase Inhibitor* (RNaseOUT);
 - 1 µl *SuperScript III RT*.
6. Homogeneizar (com dedo), fazer uma centrifugação breve.
7. Incubar 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 55°C e parar a reação pelo aquecimento a 70°C durante 15 minutos (termociclador T-Gradient – Biometra).
8. Armazenar a -20°C.

ANEXO IX

Procedimento da técnica de PCR em Tempo Real para HCMV utilizando o *kit CMV HHV6,7,8 R-gene™*, ref.:69-100, Argene, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França.

1. Utilizar para cada amostra e padrão uma mistura de amplificação, que consiste em 15 µl da *premix* R5 com 10 µl da amostra, tendo em conta que a *premix* de amplificação para o CMV (R5) está pronta a utilizar.
2. Realizar uma curva padrão utilizando quatro antígenios-padrão de quantificação – 1 250 (QS4), 12 500 (QS3), 125 000 (QS2) e 1 250 000 (QS1) cópias de CMV/ml.
3. Observação: Ter em conta que o valor atribuído a cada padrão dependerá do volume de extração da amostra inicial (sangue total) e do volume da eluição final, neste caso 200 µl e 50 µl, respetivamente;
4. Utilizado um controlo negativo IC2W0, que resulta da extração da água (W0) com o controlo interno IC2, ambos fornecidos pelo *kit*.
5. Após a preparação da placa, programar o aparelho de RT-PCR ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystem*) com o seguinte programa de amplificação:
 - a. Ativação da Taq Polimerase durante 15 minutos a 95°C;
 - b. 45 Ciclos de desnaturação durante 10 segundos a 95°C e hibridação e extensão durante 40 segundos a 60°C.
6. Observação: O Controlo IC2W0 será o único poço onde a leitura será efetuada a 530 e a 560 nm. As restantes serão todas a 530 nm.
7. Para os resultados serem validados, devem existir as seguintes condições:
 - Nenhum sinal de amplificação no IC2W0 a 530 nm
 - Amplificação no IC2W0 a 560 nm com *Ct* igual ou inferior a 32 ciclos;
 - O Padrão QS3 deverá ter um valor de *Ct* entre 30 e 35 ciclos;
 - O *slope* da curva padrão deverá ser superior a -3,917 e inferior a -3,103.

ANEXO X

Quadro resumo dos dados das crianças que participaram no estudo

Nº da amostra	Idade	HHV-6 Sangue total	HHV-6 Plasma	IgG anti-HHV-6	IgG HHV-6 2ª colheita	HCMV	IgG anti-HCMV	Primeira convulsão	História familiar	Dia de febre	Causa de febre
1	2A			+	+			Não	Não	1º	Não esclarecida
2	1A 11M			+	+			Sim	Não	4º	Encefalite herpes 1
4	2A	156	0	+		0		Sim	Tia	2º	Infeção respiratória alta
3	5A	0	0	-	-	0		Sim	Não	2º	Infeção respiratória alta
5	1A 10M	0	0	-	-	115219	+	Não	Pai	1º	Bronquiolite
6	1A 5M	646	0	+	+	0		Não	Não	1º	Infeção respiratória
7	1A 5M	363	0	+		499*	+	Sim	Não	2º	Dejeções diarreicas
8	7M	0		-		5464	+	Sim	Não	1º	Encefalite CMV
9	2A	276		+		0		Sim	Não	5º	Bronquiolite + OMA

Nº da amostra	Idade	HHV-6 Sangue total	HHV-6 Plasma	IgG anti-HHV6	IgG HHV6 2ª colheita	HCMV	IgG anti-HCMV	Primeira convulsão	História familiar	Dia de febre	Causa de febre
10	7M	0	0	-	-	0		Sim	Não	1º	OMA bilateral
11	3A 4M	0		+		0		Sim	Não	1º	Vômitos (GEA)
12	2A 10M	4827	4399	+		0		Sim	Não	1º	Não esclarecida
13	3A 5M	2235		+	+	0		Sim	Avó	1º	Infeção respiratória alta
14	2A 1M	1377	0	+	+	0		Sim	Não	1º	OMA e bronquiolite
15	2A 3M	0	0	-		0		Não	Irmã	2º	OMA e Infeção respiratória alta
16	10M	0	0			0		Sim	Pai	1º	Não esclarecida
17	2A 5M	0	0	-	-	0		Não	Não	1º	OMA esq.
18	2A 6M	317	80	+	+	0		Não	Sim	2º	Não esclarecida
19	2A 2M	386	169	+		0		Não	Não	1º	Infeção respiratória alta
20	11M	21291	13838	-		163**	+	Sim	Não	1º	Exantema subitum

Nº da amostra	Idade	HHV-6 Sangue total	HHV-6 Plasma	IgG anti-HHV6	IgG HHV6 2ª colheita	HCMV	IgG anti-HCMV	Primeira convulsão	História familiar	Dia de febre	Causa de febre
21	2A 6M	461	0	+	+	0		Não	Não	1º	OMA
22	1A 6M	1158	0	+	+	0		Sim	Não	2º	Infeção respiratória alta
23	2A 2M	0	0	-		0		Sim	Não	1º	Infeção respiratória alta
24	4M	0	0	-	-	0		Sim	Não	3º	Kawasaki
25	2A 4M	384		+		0		Sim	Sim	2º	Infeção respiratória
26	2A 1M	0	0	+	+	0		Sim	Não	2º	Infeção respiratória alta
27	4A 3M	0	0	-		0		Sim	Avô	1º	Infeção respiratória alta
28	1A 10M	0	0	-		0		Sim	Prima	1º	Infeção respiratória alta
29	1A 11M	0		+	+	0		Sim	Não	2º	Infeção respiratória alta
30	3A 5M	0	0	-		0		Sim	Não	2º	ITU
31	1A 3M	2386		+		0		Sim	Não	2º	Infeção respiratória alta

Nº da amostra	Idade	HHV-6 Sangue total	HHV-6 Plasma	IgG anti-HHV6	IgG HHV6 2ª colheita	HCMV	IgG anti-HCMV	Primeira convulsão	História familiar	Dia de febre	Causa de febre
32	1A 7M	0	0	-		0		Sim	Prima	3º	Não esclarecida
33	10M	1080	95	+	+	2101	+	Sim	Não	3º	OMA
34	1A 5M	0	0	-		0		Sim	Tia-avó	2º	Meningite
35	2A 6M	73996	20904	-		0		Não	Não	10º	Sinusite etmoidal
36	2A	0		+		0	+	Não	Não	1º	Infeção respiratória alta
37	1A 6M	1424		+		0		Sim	Pai	2º	Não esclarecida
38	11M	164	0	-		0		Sim	Não	2º	Não esclarecida
39	1A 2M	0	0	-		2694	+	Sim	Não	1º	Infeção respiratória alta
40	3A 8M	0	0	+		0			Não		
41	2A 9M	0	0	-		0		Sim	Não	1º	OMA
42	1A 4M	1117	0	+		0		Sim	Mãe	1º	Amigdalite

Nº da amostra	Idade	HHV-6 Sangue total	HHV-6 Plasma	IgG anti-HHV6	IgG HHV6 2ª colheita	HCMV	IgG anti-HCMV	Primeira convulsão	História familiar	Dia de febre	Causa de febre
43	1A	0	0	-		0		Sim	Mãe	1º	Infeção respiratória alta
44	1A 9M	664		+		0		Sim	Não	7º	Encefalite EBV
45	8M	0		-		0		Sim	Pai	1º	Não esclarecida
47	5A 9M			+		0		Sim	Não	1º	Não esclarecida
46	1A 5M	122	0	+		0		Sim	Pai	1º	OMA
48	7M	30800		-		2510	+	Sim	Não	1º	Inf. resp. viral em CMV cong.
49	2A 10M	0	0	-		0		Não	Mãe	1º	Não esclarecida

*Quantificado por PCR real time *in house*.

** A extração foi realizada com 100 µl, metade volume aconselhado pelo *kit*.

ANEXO XI

Quadro resumo dos resultados obtidos na serologia e PCR para o HHV-6.

Amostra	1ª Colheita				2ª Colheita	
	IgG (n=48)	IgM (n=48)	PCR		IgG (n=16)	IgM (n=16)
			ST (n=46)	Plasma (n=35)		
1	+	-			+	-
2	+	-			+	-
3	-	-	-	-	-	-
4	+	-	156	-		
5	-	-	-	-	-	-
6	+	-	646	-	+	-
7	+	-	363	-		
8	-	-	-			
9	+	-	276	-		
10	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-			
12	+	-	4827	4399		
13	+	-	2235		+	-
14	+	Indeterminado	1377	-	+	-
15	-	-	-	-		
16			-	-		
17	-	-	-	-	-	-
18	+	Indeterminado	317	80	+	-
19	+	-	386	169		
20	-	-	21291	13838		
21	+	-	461	-	+	-
22	+	-	1158	-	+	-
23	-	-	-	-		
24	-	-	-	-	-	-
25	+	-	384			
26	+	-	-	-	+	-
27	-	-	-	-		
28	-	-	-	-		
29	+	-	-		+	-
30	-	-	-	-		
31	+	-	2386			

Amostra	1ª Colheita				2ª Colheita	
	IgG	IgM	PCR		IgG	IgM
			ST	Plasma		
32	-	-	-	-		
33	+	+	1080	95	+	+
34	-	-	-	-		
35	-	-	73996	20904		
36	+	-	-			
37	+	Indeterminado	1424			
38	-	-	164	-		
39	-	-	-	-		
40	+	-	-	-		
41	-	-	-	-		
42	+	-	1117	-		
43	-	-	-	-		
44	+	-	664			
45	-	-	-			
46	+	-	122	-		
47	+	-				
48	-	-	30800			
49	-	-	-	-		

Legenda: cinzento (ausência de amostra); laranja (PCR +, IgG +); verde (PCR+, IG-);

Azul (PCR -, Ig G +); amarelo (tudo negativo)

ANEXO XII

Comparação dos resultados da técnica da ELISA com resultados a técnica de IFA.

Amostra	IgM anti-HHV-6		IgG anti-HHV-6		IFA
	1ª Colheita	2ª Colheita	1ª Colheita	2ª Colheita	
1	0,4	0,4	2,7	3,0	
2	0,2	0,2	1,5	2,5	
3	0,4	0,4	0,6	0,4	
4	0,2		2,4		+++
5	0,4	0,5	0,3	0,4	
6	0,6	0,6	4,4	4,2	++++
7	0,3		3,0		+
8	0,3		0,3		
9	0,5		2,9		++
10	0,2	0,2	0,2	0,3	
11	0,3		2,1		
12	0,4		3,6		+++
13	0,4	0,6	2,0	2,9	+++
14	1,0	0,6	2,6	2,4	+++
15	0,2		0,3		
17	0,4	0,4	0,4	0,5	
18	1,1	0,8	2,4	2,8	++
19	0,2		2,3		+
20	0,2		0,8		-
21	0,3	0,8	3,4	2,8	+++
22	0,4	0,5	3,5	3,6	+++
23	0,2		0,8		
24*	0,3	0,3	0,4	1,3	-
25	0,3		1,3		++
26	0,4	0,4	2,9	2,8	
27	0,3		0,9		-

Amostra	IgM anti-HHV-6		IgG anti-HHV-6		IFA
	1ª Colheita	2ª Colheita	1ª Colheita	2ª Colheita	
28	0,7		0,1		
29	0,5	0,5	2,8	2,8	
30	0,2		0,7		
31	0,4		1,2		++
32	0,3		0,4		
33	3,1	2,0	3,3	3,5	++++
34	0,2		0,8		
35	0,8		1,0		-
36	0,2		2,9		
37	0,9		1,3		+++
38	0,2		0,9		-
39	0,3		0,3		
40	0,3		2,0		
41	0,2		0,2		
42	0,3		1,8		+
43	0,2		0,2		
44	0,3		2,3		++
45	0,2		0,3		
46	0,2		2,1		++
47	0,3		3,5		
48	0,2		0,3		-
49	0,3		0,1		

*Na amostra 24 também se fez a técnica IFA para a amostra de soro da 2ª colheita, uma vez que se suspeitava de seroconversão.